



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Doctorado en NEUROCIENCIA
Facultad de Medicina
Dpto. de Anatomía, Histología y Neurociencia

TESIS DOCTORAL

*BIOMATERIALES DE QUITOSANO Y SUS
MODIFICACIONES MEDIANTE LA MEZCLA CON
GELATINA Y POLI-L-LISINA PARA SU APLICACIÓN EN
LA REPARACIÓN DE LESIONES MEDULARES*

Eduardo Martín López

Dir: Manuel Nieto Sampedro

Dpto. de Neurobiología Funcional y de Sistemas

Instituto Cajal (CSIC)

Manuel Nieto Sampedro, Profesor de investigación en el Departamento de Neurobiología Funcional y de Sistemas del Instituto Cajal (CSIC), informa que:

El trabajo de investigación propuesto como Tesis Doctoral por D. EDUARDO MARTÍN LÓPEZ, realizado bajo mi dirección y titulado: *“Biomateriales de quitosano, y sus modificaciones mediante la mezcla con gelatina y poli-L-lisina, para su aplicación en la reparación de lesiones medulares”*, contiene las siguientes aportaciones originales:

1. Los geles de quitosano preparados a partir de soluciones al 2% son más consistentes y moldeables que los preparados al 1% y, además, promueven más adhesión y proliferación de células de las líneas C6 y PC12.
2. Las mezclas de quitosano con gelatina y PLL alteraran las propiedades adhesivas y neuritogénicas para las células PC12 con respecto a las mismas mezclas realizadas con quitosano al 1%, de modo que las relaciones en peso óptimas fueron de 0.4 y 0.01 para la gelatina y la PLL, respectivamente.
3. Las mezclas de quitosano al 2% con gelatina, PLL o ambas a la vez, inducen interacciones electrostáticas entre los polímeros que alteran su estabilidad térmica y modifican la morfología y porosidad del quitosano.
4. La mezcla de *quitosano + gelatina* permite la adhesión neuronal y promueve la proliferación de astrocitos y células de glía envolvente de bulbo olfativo (GEBO), además de ser un excelente sustrato para promover la emisión y elongación de neuritas de ganglios de la raíz dorsal.
5. Los puentes de *quitosano + gelatina*, aplicados solos o conjuntamente con trasplantes de células de GEBO, no promovieron regeneración axonal central ni invasión celular a través de los poros de su estructura, traducido todo ello en una ausencia total de recuperación funcional.

Este trabajo reúne todos los requisitos necesarios para ser defendido como tesis doctoral y para ser recogido en artículos científicos que se encuentran en preparación. Por lo tanto, autorizo su defensa pública para la obtención del título de doctor:

Manuel Nieto Sampedro
Madrid, a de Septiembre de 2008

AGRADECIMIENTOS:

Dicen los taurinos que “no hay quinto malo”. Para esta tesis, sin embargo, hubo que esperar hasta el sexto (...el sexto año) para rematar la faena completa que condujo a la escritura de este libro. En el público en general y en la presidencia (o tribunal) en particular quedará la decisión de juzgar este trabajo y de conceder los trofeos oportunos.

Aún recuerdo aquella calurosa tarde de un verano de julio en la que, casi por casualidad, llegué a las puertas del Instituto Cajal para mantener una entrevista con el que, según me habían dicho, era uno de los científicos más importantes de este país. Recuerdo mi cara de susto y mi estado explosivo de nervios (que ya no se han vuelto a separar de mí) mientras charlaba con ese investigador que, para mi sorpresa, no llevaba bata (cuantos tópicos tiene uno en la cabeza). Tras la entrevista, este investigador me ofreció la oportunidad de comenzar en su laboratorio la tesis doctoral, y desarrollar, creo yo, uno de los trabajos más apasionantes que se pueden hacer. Por esta confianza prestada, por su profesionalidad y sabiduría, además de por la magnífica oportunidad que me brindó, tengo que dar el mayor de mis agradecimientos al profesor *Manuel Nieto Sampredo*.

Sin embargo, con el paso del tiempo me fui dando cuenta de que este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda, ánimos y amistad de mucha gente con la que me he cruzado a lo largo de todos estos años. Por ejemplo, no podré olvidarme nunca de ese personaje tan peculiar, al cual aún hoy me cuesta entender en castellano, y que en su día fue el responsable de ponerme en contacto con Manolo, que es el Dr. *Julian Scott Taylor*, al cual agradeceré siempre la ayuda y confianza que depositó en mí.

Por supuesto, la gente de mi laboratorio, el B-21, tanto los que están como los que se fueron, que son los principales responsables de que este trabajo haya llegado a buen puerto. El primero al que conocí fue a *Wolfi*, becario que llegó al laboratorio al poquito de entrar yo, y con el casi desde el principio he mantenido una excelente relación laboral y de amistad. A él tengo que agradecer no solo su ayuda en estos años, sino también algunos de los momentos más divertidos y especiales que se han vivido en el laboratorio, y que, sin duda, han ayudado a poner esos puntos de distensión tan necesarios en este tipo de trabajos. Así que, *gracias Wolfi, eres un tío grande*. También tengo que dar gracias a las dos personas que en aquel momento estaban terminando su tesis, y que me enseñaron casi todas las técnicas de trabajo que utilizo, que son *Sara Caballero*, que al poco tiempo se fue a su tierra (Méjico) y a *Vilma Muñetón*, que se fue, pero regresó y se volvió a ir. A ambas, gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos y, a Vilma, suerte con tu futura hija. Gracias también a los técnicos de laboratorio, en primer lugar a *Sandra*, que me enseñó todo lo que sé sobre cultivo de glía envolvente y, sobre todo, a ser meticuloso y ordenado en el trabajo; a *Jesús*, que conoce todos los entresijos del laboratorio; y gracias también a *Mary*, “la gitana”, que estuvo el tiempo suficiente para trabajar al máximo y llenar de alegría el laboratorio. Posteriormente fue llegando gente nueva al laboratorio, gente que siempre ha estado dispuesta a ayudar. Gracias a *Diego* y *Bea*, que, quién lo iba a decir, encontraron el amor

entre estas paredes, y gracias especialmente a *Manolo Nieto Jr.*, al cual nunca podré agradecer lo suficiente todo lo que me ha enseñado y la ayuda que en todo momento ha estado dispuesto a ofrecirme, sin la cual nunca hubiera sabido terminar gran parte de este trabajo. Gracias también a aquella gente que en algún momento me ayudó a sacar el trabajo para adelante con su profesionalidad y dedicación, como son *Carmen Cantó*, *Jorge Collazos*, *Margarita Darder* y *Fausto Rubio* el cual me ha ayudado con todo el análisis físico-químico; y más recientemente, la nueva incorporación del laboratorio, *Lorenzo Romero* (con la de veces que he escuchado decir: ¿alguien tiene la tesis de Lorenzo?).

Y ya va siendo hora de que agradezca a aquellas personas que más me han marcado en todo este viaje, y a los que agradezco enormemente haber conocido, que son los que yo llamo “la gente del laboratorio de abajo”, el A-21. Quién me iba a decir a mí que allí me iba a encontrar al grupo de gente que iban a acabar siendo, además de excelentes investigadores, mis mejores amigos: *Fer*; con el que congenié desde el principio. Además de ser un excelente profesional (has sido el primero en acabar la tesis), eres mejor persona y amigo. Contigo he pasado quizás los momentos más divertidos de estos últimos años, gracias a ese humor tan particular que te caracteriza (siempre recordaré la historia de “Sara” y del “corredor de marcha”), y a la vez, has demostrado un “saber estar” cuando la ocasión lo merecía (mira que has intentado conmigo la “selección de público”, aunque no sé si con resultados). Eres una excelente persona y espero que tengas una carrera investigadora brillante, que seas muy feliz en tu recién estrenado matrimonio con *Silvi*, y, sobre todo, que yo lo vea y comparta contigo. El segundo en discordia, *Blanchi*: ¿que puedo decir de ti?, necesitaría todo un libro como esta tesis para poder escribir todas aquellas cosas que me han marcado a lo largo de estos años de convivencia. Te agradezco que seas como eres, tu energía, tus ánimos y todo lo que me has ayudado con las malditas “enchitin”, con las “ratas trepadoras” y con el manejo de Word, entre otras muchas cosas, pero sobre todo tu disposición para todo en cualquier momento. Siempre recordaré los momentos buenos que hemos pasado juntos, como los cafés de por la mañana, los de después de comer y los de entre medias, con los cuales nos hemos ganado ¡a pulso! ser los más voceras del Cajal (ya nos echarán de menos), y donde has descubierto mi facilidad para “meter el cuezo”; también recordaré siempre los sustos que me has metido, con los que alguna vez has estado a punto de sacarme el corazón por la boca y tu disposición como taxista. Como muy bien sueles decir: “eres una persona que deja huella”. Solamente señalar que gracias a estas dos personas no he tirado la toalla en muchos de los momentos difíciles donde a punto he estado de hacerlo, por lo que, ante todo, lo que más agradezco es haberos conocido.

Más tarde llegaron al laboratorio *Jorge* y *Lau*. ¡Madre mía lo que estaba cayendo por allí! Hay que reconocer que *Jorge* ha marcado un antes y un después en el entorno del A-21 y fuera de él, porque nadie sabe hacer la “cabronadas” que él hace como él las hace, y todo esto a la vez que trabaja a destajo (solo hay que ver como tiene el escritorio de su ordenador). Lo cierto es que eres un tío grande y divertido, y del que todos nos vamos a acordar siempre (espero que estés muchos años dándonos el coñazo). Y *Lau*, la argentina tan calladita que, cuando salta con alguna te deja en el sitio. Con *Lau* hemos conseguido

institucionalizar un curioso comportamiento que es la capacidad de evadirse del entorno independientemente del ruido que haya a su alrededor, llamándolo cariñosamente “*hacer un Lau*”. Gracias a los dos por todo y suerte a ti, *Lau*, con tu futuro hijo. Y gracias también al resto del A-21 que siempre han estado dispuestos a ayudarme con todo y con los que he disfrutado de múltiples comilonas de productos de la tierra, como son *Laura Mascaraque, Juan de Carlos, María* y a *Ana*, que se nos fue al otro lado del charco.

Y no quisiera olvidarme de otra mucha gente del Cajal sin la cual no hubiera sido posible acabar nada de este trabajo. Gracias a *Oskar* y *Noelia* que nos han acompañado bajando al comedor a diario, y con los cuales he aprendido que 1 minuto no son 60 segundos, sino más; y a *Carol*, que sabe vivir la fiesta a tope. Gracias a la gente de administración, a *Pepa, Concha, Ana, Irene,...*; a las chicas de portería, *Isabel, Chus, Bárbara*; a las de biblioteca *M^a Ángeles* y *Reyes*, que te buscan los artículos allí donde nadie sabe que los hay; a las de la limpieza, *Mayte* y *Carmen*, que han sido las sufridoras, junto con el *Blanchi*, de nuestras voces más madrugadoras; a los del servicio técnico, *Raúl, José Luis, Carlos*, que me han sacado de un apuro en más de una vez; a los del almacén, especialmente a *Jesús* y sus chistes; a los de informática, (si no fuese por *Ángel*) y a todo el personal de animalario, que me ha cuidado a las ratas como nadie; y quiero agradecer especialmente al servicio de microscopía confocal, a *Carmen* y a *Belén* que me han ensañado casi todo lo que se de microscopía y análisis de imagen. Y gracias en general a toda esa gente del Cajal con la que he pasado momentos excepcionales.

Por último, quiero agradecer a todos los que no han estado cerca de mí en el Cajal pero que me han apoyado y animado en todo momento, incluso en las situaciones más difíciles, que, como las Meigas, “*haberlas, haylas*”. Gracias, como no, a mis padres *Eduardo* y *Carmen*, y a mi hermana *Ana*, que nos dio un susto de muerte a la mitad de esta aventura, pero del que hemos remontado juntos. Gracias al resto de mi familia, a mis tíos y primos “los toledanos” y a los del pueblo, especialmente a mi tía *Adela* que me ha ayudado a su manera, con sus “*yervas*”, y gracias a mi prima *Raquel* que ha sabido estar junto a mí en más de una de mis comeduras de coco.

Y gracias también a todos mis amigos, los cuales me han estado preguntando una y mil veces: ¿pero acabas ya?; gracias *Val, Carmen, Rosa, Antonio, las Gemas, Alberto, Tere, las Lauras, Joaquín, Esther* y, como no, a *Juan Carlos*, que me ha aguantado 4 años viviendo en su piso y me ha animado como nadie.

Creo que ya están todos los que son, aunque seguro que no son todos los que están. Gracias a todos por vuestra confianza, ánimo y ayuda, y espero que esto solo sea el principio de una larga e intensa aventura que me gustaría compartir al lado de todos vosotros.

ABREVIATURAS:

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ASIA	Asociación Americana de Lesión Medular
ATG	Análisis Termogravimétrico
ATR	Reflexión total atenuada
BBB	Escala locomotora de Basso Beattie and Bresnahan
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro
BHE	Barrera Hematoencefálica
BSA	Albúmina de Suero Bovina
CFDA-SE	Carboxi-Fluoresceína Diacetato-Succinimidil Éster
CGRP	Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina
CS	Células de Schwann
CTN	Células Troncales Neurales
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
DTMR	Dextrano Tetrametil Rodamina
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
EHS	Células de sarcoma murino de Engelbreth-Holm-Swarm
ER	Espectroscopía Raman
ESEM	Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental
FGFa	Factor de Crecimiento Fibroblástico ácido
FTIR	Espectrofotometría Infrarroja de Transformada de Fourier
G	Gelatina
GAG	Glicosaminoglicanos
G-CSF	Factor Estimulante de Colonia de Granulocitos
GDNF	Factor Neurotrófico Derivado de la Glía
GEBO	Glía Envoltente de Bulbo Olfativo
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida
GGF	Factor de Crecimiento Glial
GRD	Ganglio de la Raíz Dorsal
HCl	Ácido Clorhídrico

HEMA	Hidroxietil Metacrilato
IGF-1	Factor de crecimiento tipo Insulina-1
IgG	Inmunoglobulina G
KDa	Kilodalton
MC	Metilcelulosa
MME	Moléculas de Matriz Extracelular
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio
NF	Neurofilamento
NGF	Factor de Crecimiento Nervioso
NGS	Suero Normal de Cabra
NRO	Neuronas Receptoras Olfatorias
NT-3	Neurotrofina-3
PAA	Geles de Poliacrilamidas
PAN-PVC	Copolímeros de Poliacrilonitrilo/Polivinilcloruro
PB	Tampón Fosfato
PBS	Tampón Fosfato Salino
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PEG	Polietilenglicol
PFE	Polifosfoéster
PG	Ácido Poliglicólico
pGMA	Poli glicerilmetacrilato
PHB	Poly-3-hidroxibutirato
pHEMA	Poly(2-hidroxietil metacrilato)
pHEMA-co-MMA	Poly(2-hidroxietil metacrilato-co-metil metacrilato)
PHPMA	Poli-hidroxipropilmetacrilamidas
PLA	Ácido poli-láctico
PLC	Poli-L-láctico- ϵ -Caprolactona
PLGA	Ácido poly-láctico-co-glicólico
PLL	Poli-L-lisina
P/S	Penicilina/Estreptomicina
Q	Quitosano
<i>radc</i>	Región de alta densidad celular
SE	Superficie Específica

SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
SFB	Suero Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
TCE	Tracto Corticoespinal
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante- β
TMC-CL	Copolímero de TrimetilCarbonato-Coprolactona
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

RESÚMEN

Las lesiones medulares son una de las causas principales de discapacidad en las sociedades modernas ya que estos pacientes sufren una pérdida de función sensorial y motora por debajo del nivel de la lesión. Entre las múltiples consecuencias que conlleva una lesión medular, la aparición de un espacio o *quiste* lesivo supone una de las principales barreras para la regeneración de los axones lesionados. Para salvar este obstáculo la ingeniería de tejidos aplicada a la reparación neural, ha desarrollado la construcción de implantes que, una vez aplicados a la zona de lesión, proporcionan un sustrato de crecimiento y adhesión para células y axones regenerativos.

En este trabajo hemos ensayado un biomaterial de origen biológico, el quitosano y sus derivados mediante modificaciones con gelatina (G) y poli-L-lisina (PLL) con la finalidad de buscar la mezcla óptima para construir puentes para su implantación en un modelo animal de lesión medular. La mayoría de los trabajos *in vitro* publicados hasta la fecha con estos compuestos se han realizado con geles de quitosano a concentración del 1%. Sin embargo, para la construcción de puentes se ha descrito que la concentración adecuada es, como mínimo, al 2% (Ciardelli and Chiono, 2006). En este estudio hemos observado que el aumento de la concentración de quitosano del 1 al 2% vuelve a los geles de quitosano más consistentes y adhesivos de células PC12. Las mezclas con G y PLL de la misma manera que la descrita previamente (Cheng et al., 2003b; Mingyu et al., 2004), dieron lugar a modificaciones en las relaciones óptimas de G y PLL, pasando a ser de 0.4 y 0.01 respectivamente. Una vez establecidos los parámetros óptimos de las mezclas, el estudio físico-químico de las mismas nos permitió observar la existencia de interacciones débiles de tipo electrostático entre los polímeros, haciendo de la mezcla de *quitosano + gelatina*, la más compacta. Los estudios posteriores llevados a cabo mediante cultivos primarios y de extensión neurítica permitieron concluir, además, que la mezcla de *quitosano + gelatina* era permisiva para la adhesión neuronal, promovía la adhesión y proliferación de astrocitos y células de glía envolvente de bulbo olfativo y resultaba muy neuritogénica. Gracias a estas observaciones se pasó a construir puentes con esta mezcla para su implante en un modelo de lesión medular por transección, donde observamos que eran muy resistentes a la degradación aunque no promovieron la regeneración axonal ni la recuperación funcional, sugiriendo la necesidad de construir superficies 2D en el interior de los puentes para conseguir estas respuestas.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Anatomía general de la médula espinal	3
1.2. Lesiones de la médula espinal.....	5
1.3. Reparación de la médula espinal lesionada	8
1.3.1. Breve reseña histórica	8
1.3.2. Estrategias de reparación de las lesiones de médula espinal	11
1.4. Implantes como estrategia para reparar las lesiones de médula espinal	16
1.4.1. Implantes sintéticos.....	23
1.4.2. Implantes derivados de moléculas biológicas.....	27
2. OBJETIVOS	41
3. MATERIAL Y MÉTODOS	45
3.1. ESTUDIOS CON QUITOSANO A CONCENTRACIONES DEL 1 Y 2%....	47
3.1.1. Preparación de las soluciones de quitosano	47
3.1.2. Solidificación del quitosano para formar geles.....	47
3.1.3. Estudio de la morfología de los geles de quitosano por microscopía electrónica de barrido ambiental.....	47
3.1.4. Fabricación de superficies de crecimiento para cultivos celulares	47
3.1.5. Descongelación y crecimiento de células de las líneas C6 y PC12	48
3.1.6. Ensayos de proliferación de células C6 y PC12 basados en MTT	48
3.1.7. Análisis estadístico.....	49
3.2. MODIFICACIONES DEL QUITOSANO AL 2% MEDIANTE SU MEZCLA CON DISTINTAS PROPORCIONES EN PESO DE GELATINA Y POLI-L-LISINA.	49
3.2.1. Preparación de las soluciones iniciales	49
3.2.2. Preparación de las mezclas de <i>quitosano</i> + <i>gelatina</i> en distintas proporciones.....	50
3.2.3. Preparación de las mezclas de <i>quitosano</i> + <i>poli-L-lisina</i> en distintas proporciones:.....	51
3.2.4. Fabricación de superficies de <i>quitosano</i> + <i>gelatina</i> para cultivos celulares	52
3.2.5. Fabricación de superficies de <i>quitosano</i> + <i>gelatina</i> para medidas de humectación	53
3.2.6. Fabricación de superficies de <i>quitosano</i> + <i>poli-L-lisina</i> para cultivos celulares	53
3.2.7. Cultivo y crecimiento de células PC12.....	54
3.2.8. Estudios de diferenciación sobre las superficies de <i>quitosano</i> + <i>gelatina</i>	54
3.2.9. Ensayos de adhesión celular sobre las superficies de <i>quitosano</i> + <i>poli-L- lisina</i>	55
3.2.10. Estudios de diferenciación sobre las superficies de <i>quitosano</i> + <i>poli-L- lisina</i>	56
3.2.11. Análisis estadístico.....	56
3.3. MODIFICACIONES DEL QUITOSANO AL 2% MEDIANTE SU MEZCLA CON GELATINA ($r_g = 0.4$) Y POLI-L-LISINA ($r_{pl} = 0.01$)	56

3.3.1.	Preparación de las soluciones de trabajo	56
3.3.2.	Gelificación de las distintas soluciones	58
3.3.3.	Estudio de la morfología de los geles por microscopía electrónica de barrido ambiental	58
3.3.4.	Caracterización físico-química de los geles.....	59
3.3.4.1.	Medidas del grado de humectación de las superficies	59
3.3.4.2.	Espectrofotometría infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) ...	59
3.3.4.3.	Espectroscopía RAMAN	60
3.3.4.4.	Análisis termogravimétrico.....	60
3.3.4.5.	Calorimetría diferencial de barrido	61
3.3.4.6.	Porosimetría por adsorción-desorción de nitrógeno	61
3.3.4.7.	Porosimetría por intrusión de mercurio	62
3.3.5.	Evaluación de las mezclas en estudios <i>in vitro</i>	62
3.3.5.1.	Normativa sobre el uso de animales de experimentación.....	62
3.3.5.2.	Gelificación en placas de cultivo para ensayos de MTT	63
3.3.5.3.	Formación de superficies de gel en placas para cultivos celulares primarios y de ganglios de la raíz dorsal	64
3.3.5.4.	Cultivo y purificación de células de glía envolvente de bulbo olfativo adultas	65
3.3.5.5.	Cultivo de astrocitos postnatales.....	67
3.3.5.6.	Cultivo de neuronas de corteza e hipocampo embrionarias.....	68
3.3.5.7.	Ensayos de supervivencia y proliferación basados en MTT.....	68
3.3.5.8.	Estudios inmunocitoquímicos de los cultivos primarios	69
3.3.5.9.	Estudio de las células por microscopía electrónica de barrido	71
3.3.5.10.	Ensayos de extensión neurítica con ganglios de la raíz dorsal	71
3.3.6.	Puentes de <i>quitosano</i> + <i>gelatina</i> y estudios <i>in vivo</i>	73
3.3.6.1.	Construcción de puentes de <i>quitosano</i> + <i>gelatina</i> con $r_g = 0.4$	73
3.3.6.2.	Marcaje de células de glía envolvente de bulbo olfativo con el colorante vital CFDA-SE:.....	74
3.3.6.3.	Cirugía de implante de los puentes y trasplantes celulares.....	74
3.3.6.4.	Trazado anterógrado del tracto corticoespinal.....	76
3.3.6.5.	Estudio funcional de evaluación locomotora en campo abierto mediante la escala BBB	77
3.3.6.6.	Estudios anatómicos.....	78
3.3.7.	Análisis estadístico.....	83
4.	RESULTADOS	85
4.1.	ESTUDIOS CON QUITOSANO A CONCENTRACIONES DEL 1 Y 2%....	87
4.1.1.	Morfología de los geles de quitosano al 1 y 2%	87
4.1.2.	Ensayos de supervivencia y proliferación de las líneas celulares C6 y PC12 basados en MTT.....	89
4.2.	MODIFICACIONES DEL QUITOSANO 2% MEDIANTE SU MEZCLA CON DISTINTAS PROPORCIONES DE GELATINA Y POLI-L-LISINA Y EFECTOS SOBRE CÉLULAS PC12	93
4.2.1.	Medidas del grado de humectación en superficies de <i>quitosano</i> + <i>gelatina</i>	93
4.2.2.	Estudios de diferenciación sobre superficies de <i>quitosano</i> + <i>gelatina</i>	94

4.2.3.	Estudios de adhesión a superficies de <i>quitosano</i> + <i>poli-L-lisina</i>	98
4.2.4.	Estudios de diferenciación en superficies de <i>quitosano</i> + <i>poli-L-lisina</i> ...	99
4.2.5.	Relaciones en peso de gelatina y poli-L-lisina óptimas para modificar el quitosano al 2%.....	103
4.3.	MODIFICACIONES DEL QUITOSANO AL 2% MEDIANTE SU MEZCLA CON GELATINA ($r_g= 0.4$) Y POLI-L-LISINA ($r_{pll}= 0.01$)	103
4.3.1.	Estudio de la morfología por microscopía electrónica de barrido ambiental	103
4.3.2.	Caracterización físico-química de los materiales	106
4.3.2.1.	Medidas del grado de humectación de las distintas superficies.....	106
4.3.2.2.	Espectrofotometría infrarroja de transformada de Fourier	107
4.3.2.3.	Espectroscopía RAMAN	112
4.3.2.4.	Análisis termogravimétrico.....	115
4.3.2.5.	Calorimetría diferencial de barrido	119
4.3.2.6.	Porosimetría por adsorción-desorción de nitrógeno	120
4.3.2.7.	Porosimetría por intrusión de mercurio	123
4.3.3.	Evaluación de las mezclas en estudios <i>in vitro</i>	125
4.3.3.1.	Ensayos de supervivencia y proliferación basados en MTT.....	125
4.3.3.2.	Estudio de las células por microscopía electrónica de barrido	140
4.3.3.3.	Ensayos de Extensión neurítica con ganglios de la raíz dorsal.....	141
4.3.3.4.	Elección de una de las superficies para construir puentes	143
4.3.4.	Puentes de <i>quitosano</i> + <i>gelatina</i> y estudios <i>in vivo</i>	145
4.3.4.1.	Aspectos macroscópicos de las médulas y los implantes	145
4.3.4.2.	Estudios anatómicos.....	146
4.3.4.3.	Estudio funcional de evaluación locomotora en campo abierto mediante la escala BBB	162
5.	DISCUSIÓN.....	165
5.1.	Estudios in vitro con geles de quitosano al 2% vs quitosano al 1%	167
5.2.	El aumento de la concentración de quitosano al 2% indujo modificaciones en los ratios de mezcla óptimos de gelatina y de poli-L-lisina.....	171
5.3.	La mezcla de <i>quitosano</i> + <i>gelatina</i> es la óptima para su utilización in vivo..	175
5.3.1.	La interacción entre el quitosano, la gelatina y la PLL da lugar a distintos complejos polielectrolíticos	175
5.3.2.	Las superficies de quitosano+gelatina promovieron la adhesión neuronal y la proliferación de células gliales.....	180
5.3.3.	La mezcla de <i>quitosano</i> + <i>gelatina</i> promueve la emisión y extensión neuríticas a partir de ganglios de la raíz dorsal.....	184
5.4.	Los puentes de quitosano + gelatina implantados tras una transección medular no promueven la regeneración axonal ni recuperación funcional	185
6.	CONCLUSIONES.....	193
7.	BIBLIOGRAFÍA	197

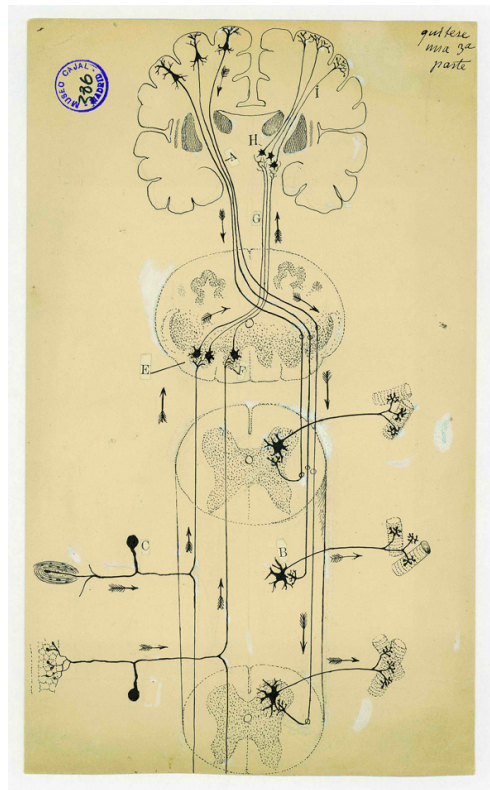
1.INTRODUCCIÓN

Las lesiones de médula espinal son una de las principales causas de discapacidad en la sociedad actual, con graves secuelas para los pacientes que las padecen. La incidencia de las lesiones medulares en España es de 20 casos anuales por cada millón de habitantes (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2003), aunque la incidencia varía en los distintos países desarrollados desde 2,1 a 123,6 casos por millón (Curt et al., 2004), causados principalmente por lesiones traumáticas (81%) como los accidentes de circulación. Este tipo de lesiones afecta principalmente a adultos jóvenes, la mayoría menores de 45 años. Puesto que la esperanza de vida de los lesionados medulares es similar a la del resto de la población, la necesidad de asistencia, tanto médica como psicológica, se prolonga mucho en el tiempo, suponiendo un enorme gasto sanitario público. Hasta el momento existen terapias que tratan el edema agudo inicial y alivian los síntomas, pero no existe ningún tratamiento que resuelva la pérdida de tejido medular que conllevan estas lesiones ni que promueva la regeneración axonal que lleve a una cura efectiva de la parálisis.

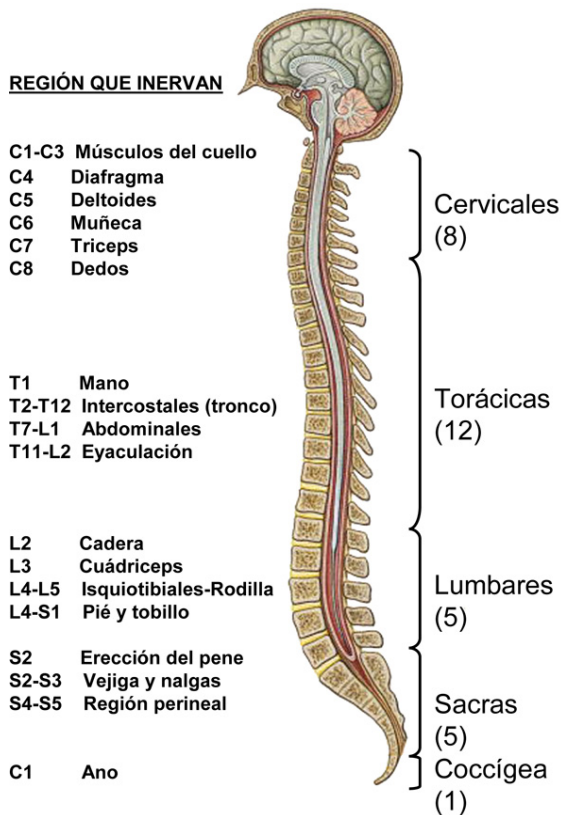
1.1. Anatomía general de la médula espinal

La médula espinal es una prolongación del sistema nervioso central (SNC) a modo de tubo, cuya función es conectar el cerebro con el resto del cuerpo. A través de la médula discurren multitud de tractos axonales cuya función es transmitir, por un lado, las instrucciones motoras desde el cerebro a los distintos músculos del cuerpo, y por otro, conducir la información sensorial recogida de las distintas partes del cuerpo hacia el cerebro. Estas conexiones fueron muy bien estudiadas por Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1905) a principios del siglo XX (**Figura 1**).

Figura 1: Vías motora piramidal descendente y sensitiva táctil ascendente representadas por Cajal. Cajal escribió: *Esquema destinado a mostrar la marcha de las corrientes en la vía sensitiva táctil y en la de los movimientos voluntarios.- A, vía piramidal; B, células motrices; C, D, células sensitivas; E, núcleo del cordón de Burdach; F, núcleo del cordón de Goll; G, vía sensitiva central.* (Imagen cedida por cortesía del Legado Cajal).



Anatómicamente la médula espinal se divide en segmentos medulares agrupados en 4 regiones principales desde la parte más rostral a la caudal: cervical-torácica-lumbar-sacra. Desde cada región se controlan las distintas partes del cuerpo (**Figura 2**). El número de segmentos medulares varía entre las diferentes especies, de modo que, por



ejemplo, en el humano está constituida por 8 segmentos cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares, 5 sacros y 1 cóxigeo, mientras que en la rata existen 8 segmentos cervicales, 13 torácicos, 6 lumbares, 4 sacros y 3 cóxigeos. La totalidad de la médula espinal está protegida en el interior del canal vertebral, donde la información nerviosa entra y sale a través de las raíces dorsal y ventral que hay en cada segmento medular.

Figura 2: Regiones inervadas por los distintos segmentos medulares. Los segmentos medulares se agrupan en regiones denominadas: cervical-torácica-lumbar-sacra-coccígea, desde las cuales se produce la inervación hacia las distintas regiones del cuerpo. Cada región va a definir las partes de cuerpo que se quedarán sin función según cual sea el o los segmentos medulares lesionados.

La información nerviosa que discurre por la médula espinal viaja a través de los haces o tractos nerviosos, los cuales se agrupan en la porción externa de la médula, constituyendo la sustancia blanca medular. En ella se encuentran los haces ascendentes, que transportan la información sensorial eferente procedente del organismo y los haces descendentes, que transportan la información aferente o motora (**Figura 3**). En la porción interna de la médula, la sustancia gris medular, se agrupan los somas neuronales, repartidos a lo largo de 10 láminas. Un grupo de estas neuronas se encarga de recibir las aferencias con la información sensorial que llega a través de las raíces dorsales, otros son interneuronas moduladoras y por último se encuentran las neuronas efectoras o motoneuronas, cuya función es transmitir, a través de las raíces ventrales, instrucciones motoras del cerebro hacia los músculos.

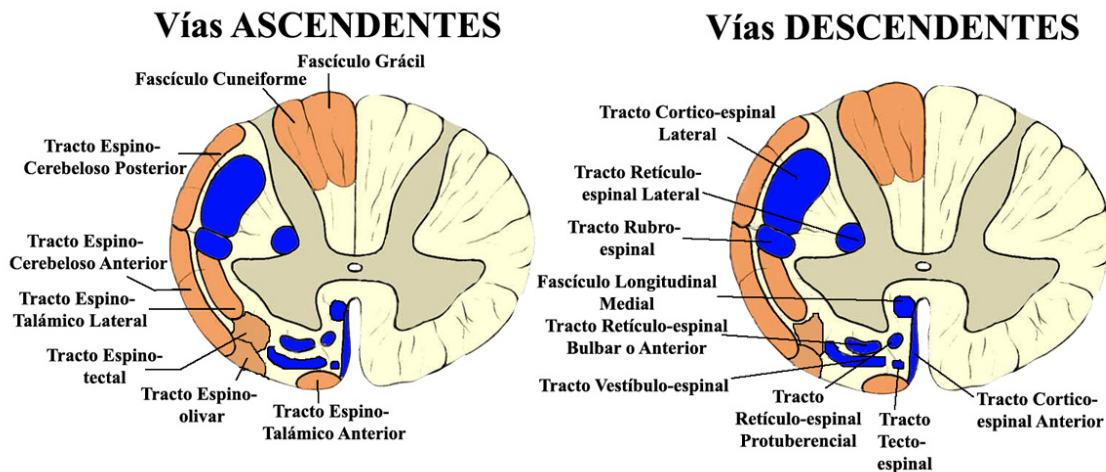


Figura 3: Tractos medulares ascendentes y descendentes. A la izquierda, principales vías medulares ascendentes, que conducen la información sensitiva. A la derecha, principales vías descendentes, que conducen la información motora.

1.2. Lesiones de la médula espinal

Las lesiones de médula espinal pueden ser debidas a multitud de causas, como los traumatismos (accidentes de tráfico, laborales, deportivos, fortuitos,...), por distintas enfermedades (tumores, infecciosas, vasculares,...) o congénitas (espina bífida). Las lesiones medulares pueden ser, además, totales o parciales, lo que determinará la gravedad de sus síntomas y las partes del cuerpo afectadas, dependiendo del nivel al que se produzcan. Así, si la lesión es a nivel cervical, se producirá una interrupción de las vías que transmiten la información de los miembros superiores, inferiores y del tronco, dando lugar a una tetraplejía. Sin embargo, si la lesión afecta únicamente a los miembros inferiores y a parte del tronco, entonces se producirá una paraplejía. Actualmente una de las clasificaciones de los tipos de lesión de médula espinal más utilizadas es la desarrollada por los Estándares Internacionales de la Asociación Americana de lesión medular para la Clasificación Neurológica (ASIA (American Spinal Injury Association), 2000), cuya escala contempla un grado para lesiones completas (ASIA A), 3 grados para las incompletas (ASIA B, C y D) y un grado para los individuos lesionados pero sin ningún tipo de afectación (ASIA E) (**Tabla 1**).

Las consecuencias derivadas de una lesión medular se deben principalmente a la destrucción parcial o total del tejido medular lesionado, lo que determina los distintos grados de lesión. De entre todas las causas citadas, las de tipo traumático son las que

producen los síntomas más graves ya que suelen ser las que inducen una mayor pérdida de tejido medular. Estas lesiones se caracterizan por presentar tres fases (**Tabla 2**):

Clasificación de las lesiones medulares en la escala ASIA	
Grado ASIA	Tipo de Afectación
A	Sin preservación de funciones motoras o sensoriales en los segmentos sacros inferiores (de S4 a S5)
B	Preservación de la función sensorial pero no motora, incluyendo los segmentos sacros más bajos (S4-S5)
C	Preservación de la función motora por debajo del nivel de la lesión aunque con una graduación menor de 3 a 5 en el rango de estiramiento de más de la mitad de los músculos principales
D	Preservación de la función motora por debajo del nivel de la lesión aunque con una graduación mayor o igual de 3 a 5 en el rango de estiramiento de más de la mitad de los músculos principales
E	Con una función sensorial y motora normal en los músculos principales y dermatomas
Graduación del rango de movimientos de los músculos principales: de 0, que representa una parálisis total, a 5 que representa un movimiento normal.	

Tabla 1: Clasificación del grado de las lesiones medulares en función de los criterios establecidos por la asociación americana de lesiones medulares para la clasificación neurológica (ASIA).

FASES DE UNA LESIÓN MEDULAR		
Aguda o 1ª (primeros segundos tras la lesión)	Semiaguda o 2ª (desde los primeros minutos a semanas)	Crónica o 3ª (desde meses a años)
Hipotensión sistémica y shock espinal	Continuación de la muerte celular	Continuación de la apoptosis desde el sitio de lesión
Hemorragia	Continuación del edema	Alteración de canales iónicos y receptores
Muerte celular por la energía del impacto e isquemia (rotura de la barrera hematoencefálica)	Continuación de los cambios electrolíticos	Formación de cavidades llenas de líquido
Edema	Producción de radicales libres	Cicatrización de la médula espinal a partir de células gliales
Vasoespasmio (reducción del flujo sanguíneo)	Peroxidación de lípidos	Desmielinización
Trombosis	Invasión de linfocitos y neutrófilos y liberación de citoquinas	Desarrollo de procesos regenerativos, incluyendo la colateralización de las neuronas
Cambios en los electrolitos	Apoptosis (muerte celular programada)	Alteración de los neurocircuitos
Acumulación de neurotransmisores	Entrada de Calcio en las células	Siringomielia (formación de quistes)

Tabla 2: Eventos más importantes y destacados que ocurren en las distintas fases de una lesión medular: aguda-semiaguda-crónica.

Fase aguda o primaria: tiene lugar desde los primeros segundos tras la lesión y se produce como consecuencia de la destrucción mecánica del tejido por la energía del impacto, conduciendo a una pérdida de función de la barrera hematoencefálica,

hemorragia local, vasoespasmo y trombosis, dando lugar a una reducción de hasta el 80% del flujo sanguíneo en la zona (Anthes et al., 1996). Las consecuencias de este tipo de daños son la reducción drástica del flujo de oxígeno y nutrientes a las células del tejido, induciendo un daño secundario sobre las células vecinas que no fueron destruidas por el trauma.

Fase semi-aguda o secundaria: tiene lugar durante los siguientes minutos o semanas, dando lugar a un aumento considerable del área lesionada. En esta fase se observan: i) aumentos de neurotransmisores excitatorios como el glutamato en el medio, produciendo excitotoxicidad neuronal y glial (Faden and Simon, 1988; McDonald et al., 1998); ii) formación de radicales libres de oxígeno y peroxidación de lípidos, que lleva a la lisis celular por rotura de su membrana (Farooqui and Horrocks, 1998); iii) liberación anormal de calcio desde las células lesionadas, que lleva a daño celular secundario, tanto neuronal como glial; iv) desarrollo de muerte celular por apoptosis, que tiene lugar después de la fase aguda de la lesión y afecta a neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y otras células de la médula espinal (Liu et al., 1997; Beattie et al., 2000); v) reclutamiento de células inflamatorias desde la periferia, lo que tiene por resultado la invasión de la médula por macrófagos, neutrófilos y linfocitos T, además de producirse una respuesta de la microglía local (Bareyre and Schwab, 2003); vi) y generación, desde las primeras horas postlesión, de una cicatriz en torno a la región lesionada, denominada *cicatriz glial*. Esta cicatriz se compone, inicialmente, de débris de mielina y oligodendrocitos que han sobrevivido a la lesión, además de células de microglía activadas, acompañadas de macrófagos que invaden la zona desde los vasos sanguíneos. Posteriormente, se produce una invasión de células meníngeas y astrocitos que migran y proliferan en esa zona, formando una barrera impide el crecimiento axonal. Estos astrocitos, que aparecen como respuesta para restituir la glía limitante (*glia limitans*) se vuelven hipertróficos y comienzan a sobreexpresar la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) formando lo que se denominan *astrocitos reactivos hipertróficos fibrosos*, los cuales envuelven la zona de lesión primaria y delimitan el área necrótica mediante la formación de una barrera de células y lámina basal (Fawcett and Asher, 1999). En esta fase se establece lo que se denomina *zona de penumbra*, una región edematosa de actividad eléctrica y funcional alterada desde la que se extiende un proceso centrífugo de muerte neuroglial.

Fase crónica o terciaria: tiene lugar en un espacio de tiempo que va de meses a años y se caracteriza por la aparición de una apoptosis retrógrada desde el sitio de lesión, desmielinización, formación de cavidades quísticas llenas de fluido y tejido conjuntivo, y alteraciones en la excitabilidad neuronal que coinciden con la aparición de estados de fuerte dolor neuropático.

Información detallada sobre la fisiopatología de las lesiones de médula espinal puede obtenerse en las revisiones de: Tator, 1995; Profyris et al., 2004; Nieto-Sampedro et al., 2002 y Profyris et al., 2004.

1.3. Reparación de la médula espinal lesionada

1.3.1. Breve reseña histórica

Hasta los primeros años del siglo XX se pensaba que los axones centrales lesionados no tenían capacidad de regenerarse o crecer, mostrando al SNC como un sistema estático y sin posibilidades de reparación. Sin embargo, los trabajos realizados, entre otros, por Stroebe (Stroebe, 1894), Marinesco (Marinesco, 1910), Tello (Tello, 1911) y por Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1914) llevaron a la conclusión de que estos axones sí presentaban respuestas de crecimiento similares a las observadas en los nervios periféricos, de modo que la ausencia de regeneración era consecuencia de la cicatriz y el ambiente inhibitorio que aparecían tras una lesión en el SNC. Entre los trabajos más importantes que condujeron al cambiar el punto de vista sobre las respuestas del SN tras una lesión, están los que realizó Ramón y Cajal, que estudió axones lesionados del cerebro, cerebelo y médula espinal, y observó que los extremos axonales presentaban las típicas respuestas de crecimiento estudiadas ya con detalle tanto en el SNP como durante el desarrollo embrionario, concluyendo (**Figura 4a, b y c**):

“En su punto de terminación, el axón, según ya entrevieron Ranvier, Stroebe y otros histólogos antiguos, y han confirmado los modernos, exhibe una hinchazón y espesamiento de forma y longitud variables. Notemos de pasada que, el abultamiento descrito por los antiguos autores representa, sobre todo, el cabo enfermo, y en vías de degeneración del viejo axón. Pero, además de los cabos enfermos y estériles (...), existen otros vivaces, susceptibles de retoñar, y a los que conviene el nombre dado por nosotros, por analogía con el cono de crecimiento de los axones embrionarios, de botón o maza de crecimiento”.

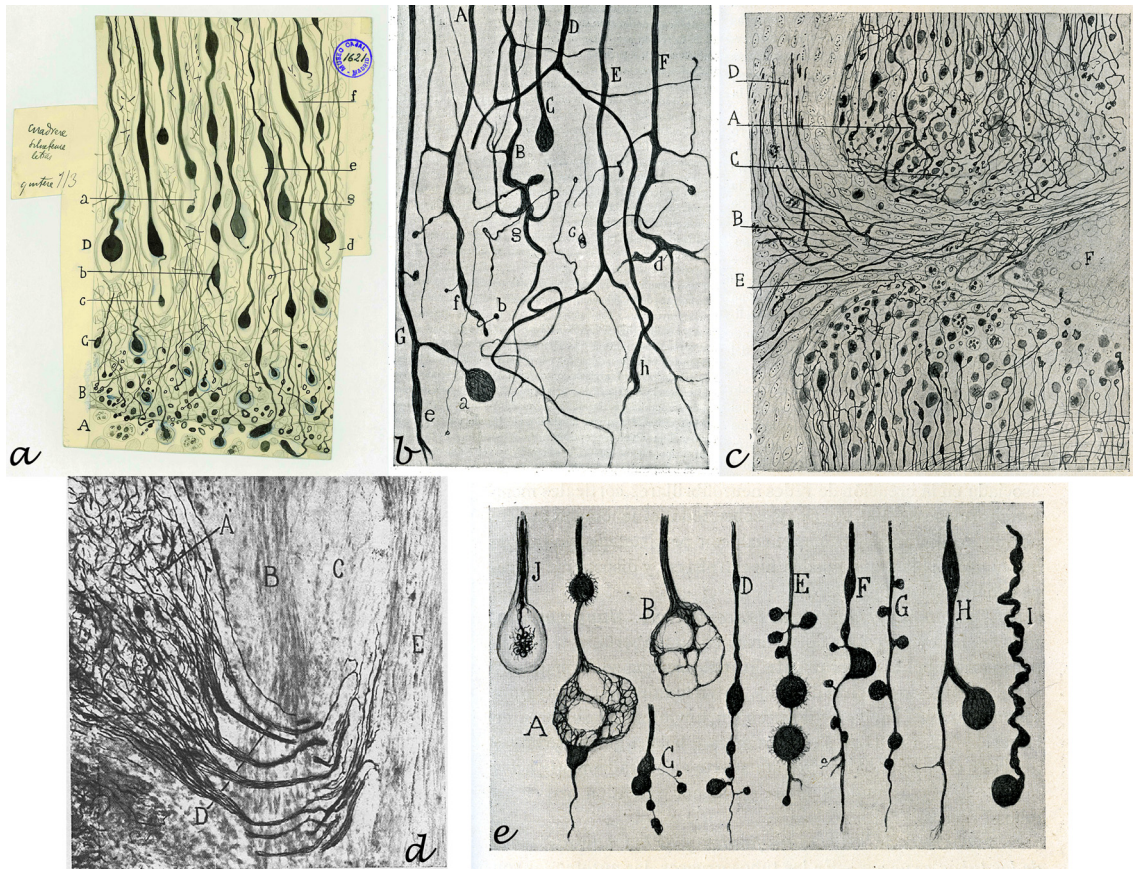


Figura 4: Botones de crecimiento y bulbos de retracción de axones centrales lesionados. Los pies de figura originales son: **a (Cajal):** Cabo central de una herida cerebral de perro de dos meses, sacrificado un día después de la operación. Corte de la sustancia blanca.- A, herida con células granulosas y mazas flotantes en el exudado; B, región de las pequeñas mazas y anillos; C, región de las mazas de mediano volumen; D, región de las mazas de los axones de las pirámides gigantes; a, c, bolita final pendiente de una maza grande; b, varicosidad con expansiones; d, espacio claro que rodea a las bolas; e, f, espacios iguales en torno de las varicosidades; g, maza de que parte fino y largo apéndice perdido en los bordes de la herida; **b (Cajal):** Diversos tipos de arborizaciones de la sustancia blanca medular del gato joven sacrificado seis días después de la operación.- A, F, G arborizaciones poco extensas; D, E, axones ampliamente ramificados y cuyas últimas proyecciones se acercan a los labios de la herida; e, h, conos de crecimiento de ramas gruesas; a, bola de detención; c, axón estéril acabado en botón de retracción; **c (Cajal):** Labios de una herida medular de un perro joven sacrificado seis días después de la operación.- A, C, fibras cordonales ramificadas en la porción necrótica de la sustancia blanca; B, fibras neoformadas llegadas de una raíz anterior regenerada; D, restos de esta raíz anterior; E, quiste en formación. Nótese junto a la multitud de fibras finas acabadas en anillos o bolas pequeñas, mientras las gruesas acaban en botones o mallas voluminosas; **d (Tello):** Microfotografía retocada, de un injerto de nervio ciático vacío de fibras en la corteza cerebral.- A, sustancia blanca de la corteza; B, limitante formada por el tejido conjuntivo; C, tejido conjuntivo con células granulosas del comienzo del ciático; D, haces de fibras que atraviesan la limitante y se dirigen al injerto; E, tejido conjuntivo en contacto con el neurilema; **e (Cajal):** Diversas formas de alteración y regresión de las bolas de retracción de los tubos de la sustancia blanca. (Imágenes cedidas por cortesía del Legado Cajal).

De este modo, Cajal vio que la irregenerabilidad descrita hasta la fecha no era cierta, sino producto de la incapacidad de los axones de cruzar la cicatriz glial y lo que él llamó la *“la ausencia de catalizadores de nutrición”*, postulando en 1905-1906 (Ramón y Cajal, 1905) las siguientes premisas:

“En suma (decíamos), incompletos y todo estos experimentos parecen probar:

- 1. Que los axones de las raíces posteriores (porción interna) y sustancia blanca medular son susceptibles de regeneración, mostrando botones de crecimiento y arborizaciones y ramas neoformadas.*
- 2. Que la creación del quiste intramedular y acaso también la falta de células capaces de segregar sustancias quimiotácticas vectoras del éxodo de nuevos axones (u otras condiciones ahora indeterminables) hacen fracasar el proceso restaurador, atrofiándose los brotes nerviosos y manteniéndose en definitiva solamente las porciones de los conductores que establecen conexiones interneuronales”.*

Estos postulados fueron apoyados, posteriormente, por los trabajos realizados por Marinesco (Marinesco, 1910), que decía: *“Si estas fibras neoformadas no restauran las antiguas conexiones, la causa no es intrínseca, sino que depende seguramente de la ausencia de un conductor adaptado al crecimiento de aquellas”*, y por los trabajos realizados por Tello (Tello, 1911) mediante transplantes de nervio ciático en corteza cerebral, el cual comprobó como los axones centrales invadían el injerto por su interior, concluyendo: *“...pero es un hecho incuestionable que las fibras han atravesado la limitante, profundizan en el tejido conectivo y penetran en el nervio injertado, donde crecen rapidísimamente”*. Tello, además, concluyó que este crecimiento exaltado era obra de agentes excitantes que llamó *materias neurotrópicas*, estableciéndose la hipótesis neurotrópica (**Figura 4d**).

En estudios posteriores, Cajal observó, además, que los axones centrales lesionados presentaban una notable capacidad de crecimiento y elongación si el ambiente de crecimiento era el propicio, lo que le llevó a exponer que:

“...los axones, en ciertas circunstancias, sobre todo cuando se acumulan en torno a la herida medular masas mesodérmicas, embrionarias o si existen células de Schwann cerca de los retoños en vías de multiplicación...las fibras de la sustancia blanca crecen a veces notablemente, generando extensas arborizaciones extracelulares”.

De este modo, y aunque los terminales lesionados presenten capacidad de crecer y elongarse, el ambiente inhibitorio de la cicatriz tras una lesión en el SNC impide a los axones crecer y regenerar. Tras estos estudios, Cajal concluyó que la ausencia de regeneración resultaba del desfavorable ambiente químico o físico que se encontraban los extremos en crecimiento, acuñando el concepto de *regeneración abortiva*, en el cual los botones de crecimiento de los extremos iban proporcionando ramificaciones que acababan reabsorbiéndose poco después sin llegar a atravesar la zona de la cicatriz, formando lo que llamó *botones de retracción*, que Cajal definió como (**Figura 4e**):

“El extremo distal, es decir, el confinante con el segmento necrótico, experimenta muchas transformaciones por retracción y acumulación protoplasmática. Atendiendo a esta propiedad de encogerse y de adaptarse progresivamente del segmento necrótico, hemos calificado dicha intumescencia de botón de retracción”

sobre los cuales anotó:

“En general, la dimensión del botón y su distancia de la herida son tanto mayores cuanto más robusta es la fibra” “En su mayoría, tan delicadas mazas y anillos residen cerca de la herida, por consecuencia de la extrema cortedad del segmento necrosado”.

A partir de estos estudios, y con la idea de que el SNC podría regenerar, comenzaron a desarrollarse multitud de trabajos en los cuales se utilizaron estrategias para intentar reparar conexiones centrales rotas, como las que ocurren en una lesión de médula espinal, principalmente a partir de implantes de nervio periférico.

1.3.2. Estrategias de reparación de las lesiones de médula espinal

Las intervenciones sobre los pacientes con una lesión medular se centran en reducir las secuelas y complicaciones secundarias, como los fallos en la función sexual, intestinal y urinaria, en minimizar los embolismos pulmonares, depresión y espasticidad, aliviar el dolor y aumentar la función. Sin embargo, hoy no existe todavía ningún tratamiento efectivo que promueva la regeneración de los axones lesionados y permita una recuperación funcional, tanto sensorial como motora. Desde que se sabe que los axones tienen capacidad de regenerar, han sido y siguen siendo múltiples los esfuerzos para encontrar la terapia o terapias que consigan promover esta regeneración. Las investigaciones sobre la reparación de las lesiones medulares se centran en estrategias

destinadas a minimizar o compensar los distintos efectos de la lesión, con objeto de obtener recuperación funcional. Uno de los aspectos más importantes para el estudio de posibles tratamientos fue el desarrollo de modelos experimentales de lesión medular en animales, donde poder estudiar tanto las consecuencias de la lesión como los distintas terapias que se puedan aplicar. Entre los modelos más utilizados se encuentran las *contusiones*, que se asemejan al 30-40% de las lesiones que ocurren en humanos; las *compresiones*, que simula la presión continua y el desplazamiento de la médula espinal como procesos habituales en lesiones medulares; las *microlesiones*, utilizadas para eliminar grupos concretos de células y examinar sus consecuencias; y las *transecciones*, que simulan laceraciones de la médula espinal.

Sobre estos modelos se han desarrollado múltiples estrategias reparadoras, que se resumen de forma general a continuación:

- i. *Estrategias protectoras*, encaminadas a la reducción de la isquemia mediante esteroides y agentes antivasoespasmos, que impiden la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE); o agentes reductores del flujo de calcio y de la formación de radicales libres y edema.
- ii. *Neuroprotección*, encaminada a promover la supervivencia de las células no dañadas y a estimular mecanismos compensadores que restituyan función utilizando el tejido nervioso no dañado por la lesión.
- iii. *Remielinización*, que compense la muerte de oligodendrocitos y los procesos de desmielinización que ocurren tras una lesión.
- iv. *Control de la inflamación*, encaminado a modular la reacción inflamatoria producida tras una lesión.
- v. *Regeneración axonal*, encaminada a promover el crecimiento de axones de modo que éstos puedan reconectar con sus dianas denervadas. Esto es particularmente importante en lesiones completas, donde para conseguir recuperación funcional sensoriomotora es necesaria la regeneración axonal. Dentro de esta estrategia se encuentran todos aquellos ensayos destinados a promover el crecimiento axonal; a eliminar las moléculas inhibitorias de la cicatriz glial; a proveer de un sustrato adhesivo y de crecimiento para los axones lesionados; etc.

Aunque todos estos aspectos son importantes, las estrategias de promoción de la regeneración axonal son las más relevantes, ya que son las únicas que pueden conseguir restituir las funciones perdidas tras una lesión medular, principalmente las que causan una transección completa de la médula espinal.

La regeneración axonal depende, en primer lugar, de la **supervivencia de las neuronas dañadas**. Esta supervivencia depende de diversas variables, entre las que están:

- i. *El tipo de neurona lesionada.* Así, las motoneuronas espinales son más resistentes a la muerte inducida por una lesión de su axón o dendritas que las neuronas sensoriales o las motoneuronas craneales (Melville et al., 1989; Snider and Thanedar, 1989; Vanden et al., 1993).
- ii. *La distancia de la lesión al cuerpo neuronal.* Cuanto más lejos del soma se encuentre la lesión, mayor será la supervivencia neuronal (Lieberman, 1971) aunque menor la respuesta a la axotomía reflejada en la expresión de moléculas asociadas al crecimiento axonal (Mason et al., 2003).
- iii. *La presencia o ausencia de factores tróficos y de factores que inducen la muerte neuronal.* Los factores necesarios para la supervivencia de las neuronas provienen principalmente de las células no neuronales vecinas al soma o localizadas en el muñón distal, por lo que la incomunicación de los axones con este segmento es responsable de un alto porcentaje de muerte (Nieto-Sampedro et al., 1982, 1983, 1984; Rich et al., 1989).

Una vez que las neuronas han sobrevivido, se hace necesario **promover el crecimiento y elongación de los axones** que han sido dañados. El crecimiento de los axones depende de distintos cambios que la axotomía induce en las neuronas, tanto en su región proximal como en la distal. Los cambios en la región proximal (región del soma), se asocian a los cambios neuronales que desarrollan el paso desde un *estado transmisor* a un *estado de crecimiento activo*, modificando su expresión génica para adquirir capacidad de respuesta al ambiente. Los cambios en la región distal se asocian a la degeneración del segmento separado del soma, la llamada *degeneración walleriana*. Esta degeneración del segmento distal es necesaria para permitir, en caso de producirse la regeneración, el paso de los nuevos brotes axonales. Aunque en el SNP esta

degeneración es muy rápida, ocurriendo en un espacio temporal de 7-15 días, y está promovida por las células de Schwann (responsables de la mielinización de estos axones), en el SNC ocurre mucho más lentamente (entre meses y años) como consecuencia de la menor presencia de células que eliminan los restos de mielina, añadiendo un problema más a la regeneración axonal dentro del SNC (Vargas and Barres, 2007). Por lo tanto, si el soma neuronal no está dañado, a la vez que ocurre el proceso de degeneración walleriana comenzarán a producirse respuestas activas de crecimiento y regeneración de la región proximal del axón lesionado. En principio todos los axones lesionados presentan una capacidad intrínseca de regenerar, pertenezcan o no al SNC, aunque esta capacidad va disminuyendo con la edad del individuo (Goldberg et al., 2002). Como ya apuntó Cajal, el hecho de que este proceso esté favorecido o inhibido depende del ambiente que rodea al axón, que en el caso del SNP es promotor de la regeneración, mientras que en el SNC es inhibitorio. Esto es debido a la presencia de moléculas inhibitorias del crecimiento axonal en la glía reactiva y a la formación de la llamada cicatriz glial en lesiones anisomórficas. Inicialmente, los axones lesionados emiten ramas colaterales sin dirección. El proceso de emisión de colaterales es una respuesta común en el crecimiento de los axones durante el desarrollo y después de lesiones axonales, formando parte de la plasticidad intrínseca al sistema nervioso. Este proceso ha sido muy estudiado y los tratamientos destinados a inducir regeneración se enfocan en promover, de manera controlada, el proceso de colateralización, ya que representa el conjunto de las respuestas de crecimiento que pueden experimentar los axones lesionados. La emisión de colaterales de los terminales axónicos lesionados aparece desde las 6 horas iniciales después de la diferenciación de los primeros conos de crecimiento (Schwab and Bartholdi, 1996), pudiendo llevar a la formación de conexiones erróneas, formaciones tipo neuromas y procesos abortivos de regeneración (Silver et al., 1982). Para un conocimiento más detallado de los procesos de colateralización axonal se pueden consultar las revisiones de Deller T. y de Hagg T. (Deller et al., 2006; Hagg, 2006).

Una vez que se sabe que los axones centrales lesionados pueden crecer y elongarse, para reparar una lesión medular hay que pensar en tipos de tratamientos que se pueden aplicar para promover y estimular su crecimiento a través de la zona lesionada. El primer problema con el que se van a encontrar los brotes axonales en regeneración es el ambiente altamente inhibitorio generado en la región donde ha ocurrido la lesión. Este

ambiente es consecuencia de la formación de la cicatriz glial y de la producción en esta zona de moléculas inhibitorias como los proteoglicanos de la matriz extracelular modificados y moléculas inhibitorias derivadas de la mielina (Nieto-Sampedro, 1999; Silver and Miller, 2004). Este tipo de problemas se han intentado resolver mediante diversos abordajes, como el transplante de células de glía envolvente de bulbo olfativo, que reducen la reactividad glial (Verdu et al., 2001), degradando los proteoglicanos inhibitorios con la enzima condroitinasa ABC (Bradbury et al., 2002; Yick et al., 2003) o bloqueando los inhibidores derivados de la mielina (Bregman et al., 1995; von Meyenburg et al., 1998). El segundo gran problema que se encuentran los axones que pretenden regenerar es el espacio físico que se genera después de la destrucción del tejido por la lesión, espacio que sigue aumentando con el tiempo como consecuencia de la muerte neuronal secundaria, formando los llamados *quistes de lesión*. Estos espacios acelulares, que en algunas ocasiones puede llegar a abarcar varios segmentos medulares (Figura 5), constituyen uno de los mayores obstáculos para los axones en crecimiento.

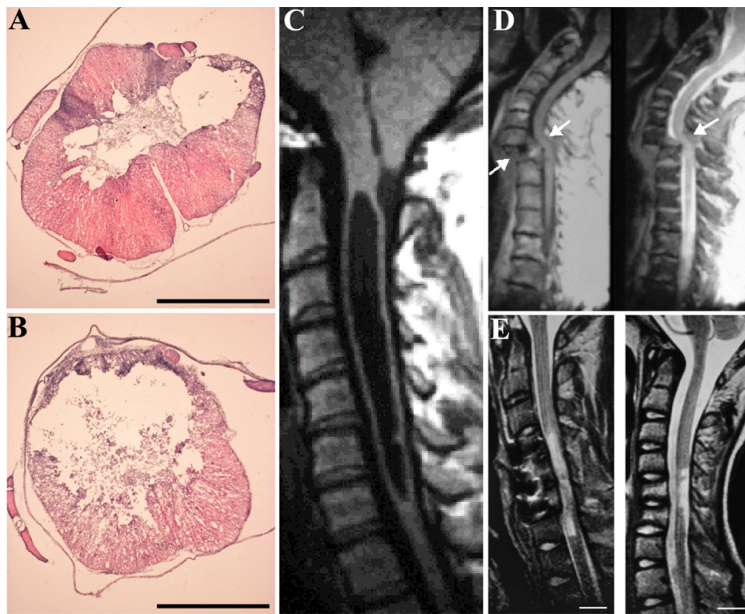


Figura 5: Quiste de lesión que aparece tras una lesión medular. A y B, cortes histológicos transversales del segmento medular T8 teñidos con hematoxilina/eosina en lesiones por contusión. En A, quiste tras la caída de un peso de 10g a 2,5cm de altura; en B, quiste tras la caída de un peso de 6,7g a 5cm de altura. C, D y E son imágenes de resonancia magnética de pacientes que han desarrollado quistes de lesión, donde se observa que la pérdida de tejido puede llegar a abarcar varios segmentos medulares. En algunas ocasiones el tipo de lesión provoca un desplazamiento completo de los muñones (D). (Barras: 500µm para A y B).

Para salvar este escollo la estrategia más utilizada es la colocación de un implante en la zona de lesión. Estos implantes pueden ser injertos de tejido autólogo, injertos acelulares o no-autólogos o contruidos a partir de derivados de biomateriales con un origen natural o sintético. La utilización de implantes es importante no solo porque supone un camino alternativo al espacio creado tras la lesión, sino también porque

aporta un sustrato adherente, promotor del crecimiento axonal y de la adhesión de células propias del sistema nervioso que ayuden en la regeneración. Además, puede promover la neovascularización y suponer un excelente vehículo para el aporte de factores tróficos, moléculas moduladoras de la inflamación y moléculas promotoras de la regeneración, como bloqueantes de inhibidores del crecimiento. Todos estos estudios se engloban dentro de lo que se conoce como *ingeniería de tejidos para la reparación neural*.

1.4. Implantes como estrategia para reparar las lesiones de médula espinal

A partir de las observaciones realizadas por Ramón y Cajal sobre la regeneración del sistema nervioso (Ramón y Cajal, 1914), y tras los trabajos de Tello en los que observó crecimiento de axones centrales lesionados tras el implante de segmentos de nervio ciático en corteza cerebral, promovido por las células de Schwann presentes en el implante (Tello, 1911), se desarrollaron multitud de trabajos donde se intentó promover la regeneración de axones centrales lesionados mediante el *implante de tejidos autólogos*, principalmente segmentos de nervio periférico.

En la década de los 40, Sugar y Gerard (Sugar and Gerard, 1940) realizaron experimentos con implantes de nervio ciático, tejido cerebral y músculo en lesiones medulares, observando la aparición de movimientos voluntarios en los miembros posteriores y mostrando evidencias de regeneración. Estos trabajos se vieron comprometidos por trabajos posteriores en los que no se encontraba regeneración (Brown and McCough, 1947; Barnard and Carpenter, 1950; Feigin et al., 1951) o se encontraba una recuperación funcional limitada (Jakoby et al., 1960; Perkins et al., 1964). Los implantes periféricos volvieron a tomar importancia gracias a los trabajos de Aguayo, que observó que injertos de nervio ciático en lesiones centrales eran capaces de inducir crecimiento axonal, además de producirse en estos axones una remielinización por las células de Schwann presentes en el segmento de nervio periférico (Aguayo et al., 1981; David and Aguayo, 1981). Desde entonces, los injertos de nervio periférico se han utilizado en multitud de modelos experimentales, donde se ha visto que implantes de raíces dorsales o ventrales en la médula permiten la regeneración de neuronas de la médula espinal, además del crecimiento axonal de motoneuronas por injertos de raíces ventrales tras rizotomía (Carlstedt et al., 1989). En otros casos se indujo regeneración del

tracto rubroespinal mediante el implante de nervio ciático tras la transección del funículo dorsolateral, observándose crecimiento axonal a través del implante únicamente cuando el modelo de lesión era sobre las regiones cervicales de la médula, que son las más próximas a los cuerpos neuronales (Fernandes et al., 1999). Otros trabajos utilizaron implantes de nervios periféricos en modelos de transección completa del segmento torácico T8, observando que los individuos que recibieron implantes presentaron mejorías parciales en test funcionales como el test de evaluación locomotora en campo abierto BBB (Fraidakis et al., 2004). Otros estudios intentaron mejorar los resultados obtenidos con estos implantes mediante la aplicación conjunta de factores tróficos exógenos como el factor de crecimiento fibroblástico ácido (FGFa), que forma parte de una familia de neurotrofinas que promueven la proliferación celular, migración, diferenciación y supervivencia, observando mejorías con respecto al tratamiento aislado del implante (Cheng et al., 1996; Lee et al., 2002; Lee et al., 2006). Además de los trabajos realizados con nervios periféricos, se han ensayado otros tipos de implantes autólogos para promover la regeneración axonal en lesiones del SNP. Ya que la regeneración se ve favorecida por las moléculas de membrana basal, como la laminina, colágeno, etc, se han implantado distintas regiones del organismo que tienen un alto contenido en estas moléculas de matriz extracelular, y que, por tanto, favorecen la migración y adhesión de células de Schwann y promueven la regeneración. Dentro de este grupo se encuentran los injertos de vasos sanguíneos rellenos con colágeno (Choi et al., 2005) o rellenos con tejido muscular (Battiston et al., 2000; Raimondo et al., 2005), que mostraron resultados similares a los implantes de nervios periféricos. En la misma línea se han mostrado útiles los injertos de tejido epineural (Karacaoglu et al., 2001), así como los injertos de tendón, que suministran un sustrato permisivo para la migración de las células de Schwann (Brandt et al., 1999). En modelos de lesión del SNC y SNP también se han ensayado con éxito la aplicación de puentes contruidos con tejido amniótico (Davis et al., 1987; Mohammad et al., 2000) o con submucosa del intestino delgado (Hadlock et al., 2001), que favorecen la extensión de neuritas y la regeneración.

La eficacia observada con los injertos de nervio periférico se asocia a un ambiente promotor del crecimiento, favorecido principalmente por las células gliales que acompañan a los axones del SNP (células de Schwann). Esto condujo a la utilización de *transplantes celulares* en modelos de lesión medular, mediante el aislamiento y purificación de aquellos tipos celulares en los que se hubiera comprobado su eficacia

para facilitar y promover la regeneración axonal. Entre estos tipos celulares se encuentran las *células de Schwann* (CS), célula glial típica del SNP, que son las principales responsables de generar un ambiente promotor del crecimiento y remielinización axonal (Bunge, 1993), habiéndose demostrado que su transplante promueve el crecimiento axonal en lesiones del SNC (Xu et al., 1995; Guest et al., 1997b; Keirstead et al., 1999; Oudega and Xu, 2006). Otro de los tipos celulares más populares utilizados en regeneración es la *glía envolvente de bulbo olfativo* (GEBO). Estas células modulan el crecimiento de los axones olfativos desde el epitelio hasta el bulbo olfativo, envolviendo a los axones en pequeños paquetes (**Figura 6**), pasando a denominarse *glía envolvente*.

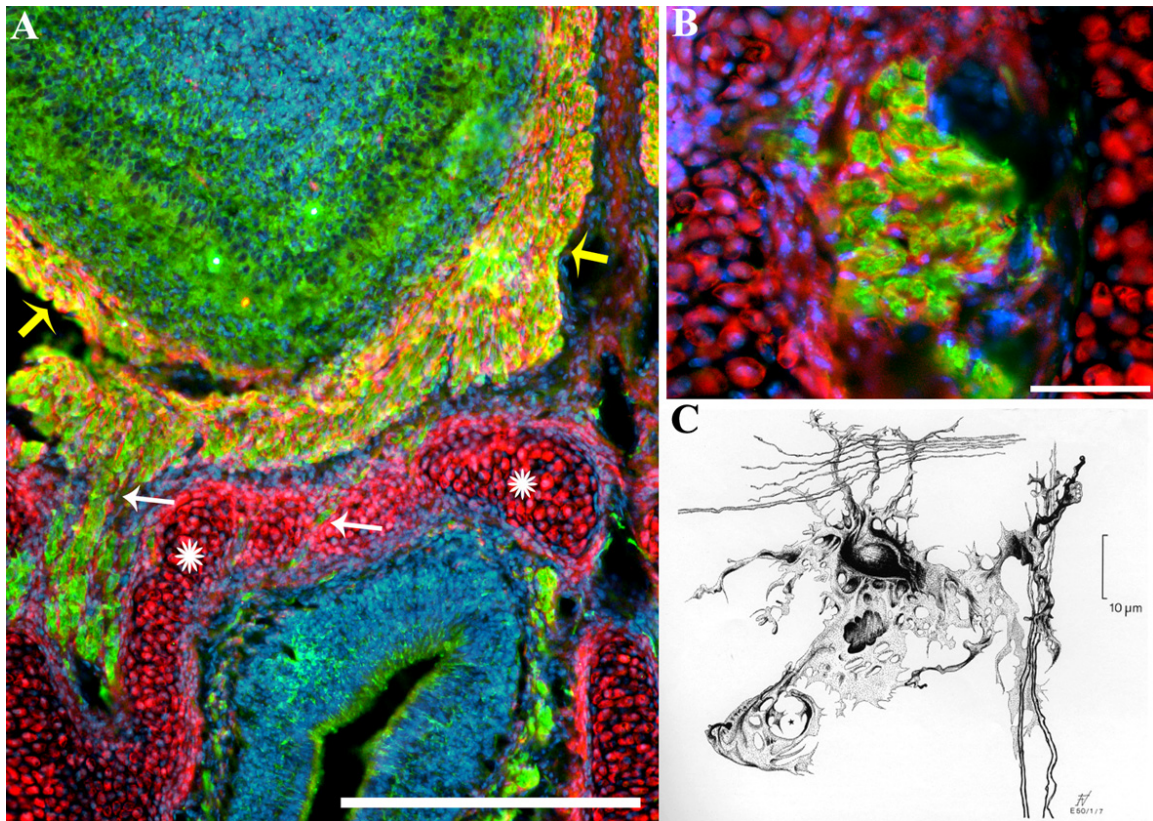


Figura 6: Células de glía envolvente de bulbo olfativo envolviendo a los axones de las células receptoras olfativas. B y C, marcaje neuronal con TuJ1 (verde) y de células de glía envolvente y condroblastos de la placa cribosa con S100B (rojo) en ratones C57/B6tgN en estadio de desarrollo E16. Se puede observar como los axones de las neuronas olfativas salen del epitelio olfativo agrupadas en paquetes axonales que atraviesan la placa cribosa (marcada con asteriscos) hasta llegar al bulbo olfativo (B). En su camino, se encuentran constantemente envueltas por células de glía envolvente (flechas blancas), las cuales llegan al bulbo permaneciendo, únicamente, en la capa de las fibras del bulbo olfativo (flechas amarillas). En C se muestra un detalle de un conjunto de paquetes de fibras axonales olfativas (verde) que se encuentran envueltas por células de glía envolvente (rojo) en su salida a través de la placa cribosa compuesta de condroblastos. En A, dibujo a cámara lúcida de una célula de glía envolvente del bulbo de erizo envolviendo a los axones olfativos mediante la emisión de procesos celulares laminares, realizado por Valverde y López-Mascaraque (1991). (Las imágenes B (barra de 300µm) y C (barra de 50µm) están cedidas por cortesía de Albert Blanchart Aguado).

Estas células presentan un fenotipo intermedio entre los astrocitos y las CS (Doucette, 1984; Doucette, 1990; Valverde and Lopez-Mascaraque, 1991) que hacen que presente una dualidad de funciones entre ambos tipos celulares que, junto al hecho de exhibir unas potentes propiedades promotoras de la neuritogénesis (Kafitz and Greer, 1999; Sonigra et al., 1999), ha hecho de este tipo celular un candidato idóneo para ser utilizado en modelos de regeneración axonal. Las observaciones de que las células de GEBO intervienen en procesos de regeneración de los axones de las neuronas receptoras olfativas (NRO) después de lesiones del nervio olfativo (Doucette et al., 1983; Doucette, 1984; Cancalon, 1987) condujo al desarrollo de técnicas que permitieran su aislamiento y cultivo para poder ser utilizadas como herramienta en regeneración axonal (Ramon-Cueto and Nieto-Sampedro, 1992; Chuah and Au, 1993; Gudino-Cabrera and Nieto-Sampedro, 1996). Desde entonces, las células de GEBO han sido ampliamente utilizadas en trasplantes para promover el crecimiento y remielinización de axones en modelos de lesión del sistema nervioso tanto central como periférico. Además de esto, y aunque en estado normal no lo hagan, se aprovechó la capacidad que estas células tienen para remielinizar axones tras una lesión (Devon and Doucette, 1992; Franklin et al., 1996; Li et al., 1998). Cuando se trasplantan en modelos de lesión periférica del nervio ciático (Verdu et al., 1999), y en modelos de rizotomía de la médula espinal (Ramon-Cueto and Nieto-Sampedro, 1994; Navarro et al., 1999; Taylor et al., 2001; Pascual et al., 2002), estas células promueven la regeneración axonal con recuperación funcional. En modelos de lesión central, principalmente lesiones de la médula espinal, los resultados son más controvertidos. Por ejemplo, se ha descrito que las células de GEBO transplantadas en la médula migran significativamente por el parénquima medular (Gudino-Cabrera and Nieto-Sampedro, 1996; Imaizumi et al., 1998; Gudino-Cabrera et al., 2000), aunque otros trabajos no observan tal migración (Gomez et al., 2003). Cuando se trasplantan en lesiones medulares, se ha descrito que las células de GEBO promueven la regeneración axonal con recuperación funcional total o parcial (Li et al., 1998; Ramon-Cueto et al., 1998; Ramon-Cueto et al., 2000; Lu et al., 2002; Verdu et al., 2003; Garcia-Alias et al., 2004; Polentes et al., 2004; Fouad et al., 2005; Deumens et al., 2006a; Lopez-Vales et al., 2006; Lopez-Vales et al., 2007), mientras que otros trabajos no han observado tales respuestas ni regeneración con recuperación funcional (Gudino-Cabrera et al., 2000; Takami et al., 2002; Collazos-Castro et al., 2005; Deumens et al., 2006b).

Otros tipos celulares transplantados han sido las *células troncales neurales* (CTN), capaces de generar la mayor parte de los tipos celulares del SNC (Martinez-Serrano et al., 2001; Myckatyn et al., 2004). En lesiones medulares, se diferencian hacia fenotipos neuronales y gliales (Chow et al., 2000; Cao et al., 2001), promoviendo la regeneración axonal (McDonald et al., 1999). También se han utilizado *macrófagos*, promoviendo una regeneración funcional parcial (Schwartz et al., 1999) y *células troncales de médula ósea* (CTMO). Estas últimas se utilizan desde que se demostró que podían diferenciarse hacia fenotipos neurales (Eglitis and Mezey, 1997; Woodbury et al., 2000; Deng et al., 2001; Mezey et al., 2003), favoreciendo la preservación tisular y la recuperación funcional en modelos de lesión medular (Lee et al., 2003; Zurita and Vaquero, 2004; Zurita and Vaquero, 2006).

En vista de los distintos resultados, parece conveniente un abordaje multifactorial a la hora de reparar las lesiones de médula espinal. Sería, por tanto, conveniente la aplicación de trasplantes conjuntamente con otras estrategias que mejoren su funcionalidad. En este sentido, los injertos de tejidos autólogos o los trasplantes celulares tienen una flexibilidad reducida para aplicar terapias combinadas. Con la idea de construir un sustrato susceptible de ser implantado en una lesión medular, que además tenga propiedades físico-químicas idóneas para el crecimiento y adhesión de células y axones, y cuyas características puedan ser modificadas para adaptarse a las características particulares de cada lesión, se han producido sustratos artificiales implantables, fácilmente modificables y que permiten combinar varias estrategias simultáneas. Los primeros sustratos utilizados se obtuvieron a partir de moléculas de matriz extracelular purificadas, como el colágeno (Ehrmann and Gey, 1956), extendiéndose después hacia otras moléculas de matriz extracelular y materiales sintéticos.

Teniendo en cuenta las características del SNC y los objetivos principales de la intervención, se determinó que las propiedades generales que se buscan en estos implantes artificiales deberían ser:

1. *Biocompatibilidad y biodegradabilidad.* Una de las características principales es que no deben presentar rechazo inmunológico por parte del sujeto receptor. El material debe ser degradable, ya que la presencia crónica de un material rígido

provoca compresión nerviosa y una reactividad crónica tisular al implante (Merle et al., 1989). La velocidad de degradación del implante debe ser lo suficientemente lenta como para permitir que los axones pasen bidireccionalmente hasta el muñón contrario, es decir, su tiempo de disolución debe ser acorde a los tiempos de regeneración (Schmidt and Leach, 2003). Además, los productos de degradación no deben ser tóxicos para el individuo receptor.

2. *Debe presentar una estructura porosa adecuada*, de modo que los vasos sanguíneos puedan atravesar el material para aportar los nutrientes necesarios y se puedan eliminar los productos de desecho. La influencia de la porosidad de un hidrogel en la vascularización se ha demostrado en estudios de diferenciación de células troncales humanas en geles de alginato (Gerecht-Nir et al., 2004). Son importantes, asimismo, el número, tamaño y orientación de los poros, si se busca que los axones y células del sistema nervioso puedan crecer e invadir el implante a través de ellos, manteniendo una orientación definida. En este sentido, se ha postulado que la pérdida de interconectividad de los poros puede ser la responsable de que no crezcan bien las neuritas (Patist et al., 2004).
3. *Su superficie debe ser permisiva para la adhesión y el crecimiento*. La superficie debe tener características iónicas que permitan la adhesión celular, o permitir la adhesión de moléculas de matriz extracelular como la laminina (Manthorpe et al., 1983), que favorecen el crecimiento neurítico. Sin embargo, esta adhesividad no debe ser tan fuerte que impida el crecimiento y migración de axones y células (Schense and Hubbell, 2000).
4. *Tiene que poseer una topografía superficial con texturas alineadas*, que facilite el crecimiento unidireccional de los axones en regeneración. En estudios en nervio periférico se ha observado que la microgeometría de los tubos usados en el estímulo de la regeneración afecta a la misma, siendo favorecida por las superficies lisas (Aebischer et al., 1990). Además, un sustrato alineado favorece las respuestas celulares adhesivas (Haston et al., 1983).
5. *Es conveniente que tenga actividad eléctrica*. Desde la década de los setenta existe evidencia de que los campos electromagnéticos ayudan la regeneración y la mejora funcional de los nervios lesionados (Mannard et al., 1974; Nix and Hopf,

1983; Borgens et al., 1987; Kotwal and Schmidt, 2001; Lago et al., 2005). Además, se ha comprobado que la actividad eléctrica en torno al cono de crecimiento modula su crecimiento y orientación, posibilitando el crecimiento incluso en presencia de inhibidores de mielina (Ming et al., 2001).

Hasta el momento se han ensayado multitud de biomateriales artificiales, contruidos a partir de sustancias sintéticas o semisintéticas (*implantes sintéticos*), con la finalidad de conseguir un material con mejores propiedades físico-químicas, que pueda ser utilizado terapéuticamente. Sin embargo, los materiales que provienen de moléculas de matriz extracelular, como el colágeno, la fibronectina, la laminina o matrigel, y otros que provienen de otras moléculas biológicas, como fibrina, agarosa, ácido hialurónico, alginato o quitosano (*implantes derivados de moléculas biológicas*) siguen siendo los materiales de referencia para su utilización en reparación nerviosa. Estos materiales tienen la ventaja de provenir del propio individuo o de otros organismos vivos, lo que los hace especialmente útiles en lo que a rechazo se refiere. Con todos estos materiales se busca fabricar el mejor sustrato posible para construir un puente que ayude en los procesos de regeneración axonal tras una lesión del SNC, principalmente destinado a las lesiones medulares (**Figura 7**).

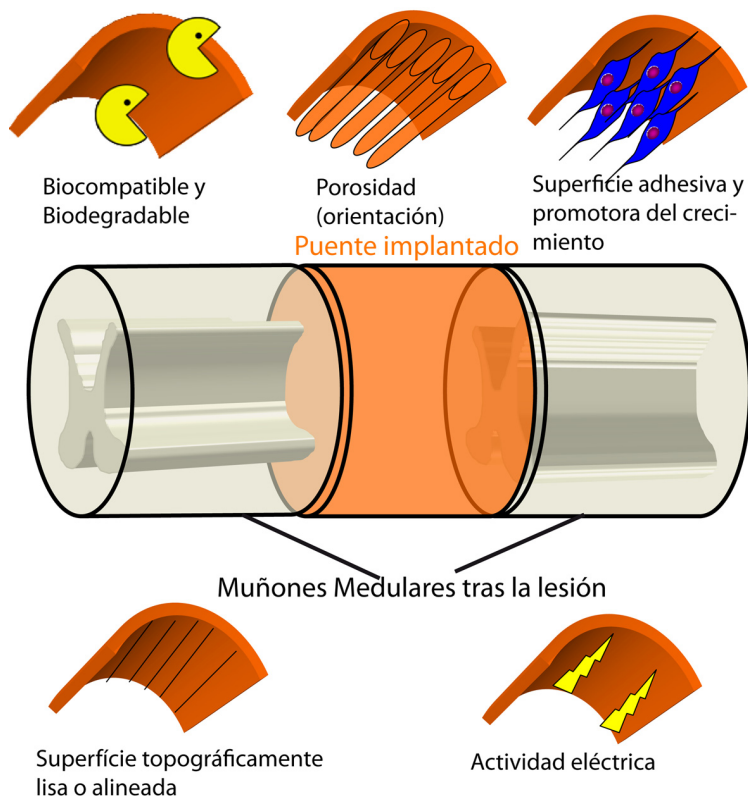


Figura 7: Propiedades principales de los puentes destinados a reparación de lesiones medulares. Estas propiedades deben ser: 1) biocompatibilidad y biodegradabilidad; 2) poseer una estructura porosa, al ser posible alineada; 3) poseer una superficie permisiva para la adhesión de axones y células propias del sistema nervioso; 4) la superficie debe presentar una estructura topográfica lisa o alineada, para inducir respuestas de crecimiento lineales; 5) las superficies eléctricamente activas se han mostrado promotoras del crecimiento y elongación axonales.

1.4.1. Implantes sintéticos

Este tipo de implantes, contruidos a partir de moléculas sintéticas o semisintéticas, surgieron con la necesidad de mejorar las propiedades físico-químicas de los materiales (ej., porosidad, velocidad de degradación, resistencia mecánica, flexibilidad, etc), buscando así un sustrato de crecimiento óptimo para ser implantado como puente en modelos de lesión medular, y, sobre todo, pensando en poder modificarlo con otras sustancias (capaces de llevar fármacos, sustancias promotoras de la regeneración, sustancias inmunomoduladores, etc) o terapias en un abordaje multifactorial. A lo largo de los últimos años se han fabricado multitud de puentes con diversas sustancias artificiales, entre los que destacan:

Poly-3-hidroxibutirato (PHB): Es un polímero de almacenamiento energético natural presente en el citoplasma de algunas bacterias y algas. El PHB es un sustrato biocompatible y de degradación lenta (Gogolewski et al., 1993). En modelos de lesión periférica se ha comprobado que promueve o incluso mejora la regeneración axonal de manera similar al tratamiento con tejido epineural (Young et al., 2002), viéndose que se reabsorbía en un plazo de 12 meses (Hazari et al., 1999; Ljungberg et al., 1999). También se han realizado modificaciones de este material añadiendo factores de crecimiento como el factor de crecimiento glial (GGF) que estimula la proliferación de las células de Schwann (Dong et al., 1995) o alginato, donde se mejora sustancialmente el porcentaje de fibras regeneradas (Mohanna et al., 2003). Los últimos estudios realizados con este material han realizado implantes de PHB con CS en su interior o con moléculas de matriz extracelular como la fibronectina, laminina o colágeno, observando que promueven la adhesión de CS y mejora la regeneración de fibras que expresan el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y del haz rafespinal (Novikova et al., 2008).

Poli (α -hidroxiácidos): Los poli (α -hidroxiácidos) incluyen al ácido poli-láctico (PLA), al ácido poli-glicólico (PG) y al ácido poly-láctico-co-glicólico (PLGA). Se ha observado que el PLA cubierto con laminina promueve el crecimiento orientado de neuritas de GRD (Rangappa et al., 2000). En modelos de regeneración periférica se observó que este sustrato sirve como matriz para favorecer la regeneración incluso en quistes de lesión grandes (Evans et al., 2000). Estudios posteriores combinando PLA con células de Schwann (Evans et al., 2002), obtuvieron peores resultados que con injertos

autólogos de nervios. También se ha comprobado la utilidad del PLGA en regeneración periférica cuando éste se transplanta *per se* o junto con células de Schwann (Hadlock et al., 2000; Bini et al., 2004).

Poli-L-láctico-ε-Caprolactona (PLC): Polímero buen promotor de la regeneración en sistema periférico, mejor incluso que los injertos autólogos de tejido nervioso en lesiones donde la cavidad quística de lesión no es muy grande, ya que permite una mejor deposición de moléculas de matriz extracelular como el colágeno (den Dunnen et al., 2000; Valero-Cabre et al., 2001; Jansen et al., 2004a).

Copolímero de TrimetilCarbonato-Coprolactona (TMC-CL): Polímero de reciente creación, cuyos productos de degradación son prácticamente inertes, y que permite la supervivencia y emisión de neuritas en su interior, además de promover la regeneración cuando se aplica junto con células de Schwann. Tiene una estructura porosa que permite la libre circulación de metabolitos y permite pensar en su utilización como vehículo para transportar moléculas (Lietz et al., 2006).

Poli-etilenglicol (PEG): Es un polímero altamente soluble en agua con propiedades adhesivas. Se ha utilizado en reparación de nervios periféricos, para fusionar los muñones lesionados (Lore et al., 1999; Donaldson et al., 2002), y en lesiones de médula espinal en SNC. En estas últimas, se ha visto que la aplicación de PEG reduce la cavitación postlesión (Duerstock and Borgens, 2002), y promueve una recuperación funcional mediada por reflejos que implican tractos axonales largos (Borgens et al., 2002).

2-hidroxietilmetacrilato (HEMA), poli-HEMA (pHEMA), Poli glicerilmetacrilato (pGMA) y Poli 2-hidroxietilmetacrilato-co-metilmetacrilato (pHEMA-co-MMA): Los geles de HEMA cargados positivamente se han utilizado recientemente en regeneración de médula espinal, realizando implantes en un modelo de transección viendo que promovían la invasión de CS, la neovascularización y la invasión neurítica, además de reducir la cavitación (Hejcl et al., 2008). En modelos de lesión del tracto óptico, el pHEMA promueve la invasión y supervivencia de CS e induce una menor reactividad glial (Plant et al., 1998). Los geles de pHEMA permiten fabricar canales orientados longitudinalmente en su interior para inducir respuestas de crecimiento alineadas si se usan en lesiones de nervio periférico o transecciones medulares (Flynn et al., 2003). El

pHEMA es un material fácilmente modificable, de modo que se ha utilizado conjuntamente con otras moléculas para crear materiales adaptados a las características del SNC. Así, se han construido puentes de pHEMA-co-MMA con una porosidad y propiedades físicas adecuadas al tejido del SNC para ser utilizadas en regeneración axonal (Dalton et al., 2002). Otros estudios han realizado mezclas de pHEMA y pGMA con colágeno, observando que eran biocompatibles y que, cuando el tamaño de poro era el adecuado, eran invadidos por tejido nervioso (Woerly et al., 1990). En modelos de lesión de médula espinal, el tratamiento de la lesión con puentes de pHEMA-co-MMA sin combinar con células o factores tróficos consiguió regenerar axones del núcleo motor del tronco encefálico (Tsai et al., 2004), aunque con escasa recuperación funcional. Para aplicaciones de terapias combinadas, los geles de pHEMA-co-MMA se han tratado con la finalidad de retener y liberar neurotrofinas como el NGF (Piotrowicz and Shoichet, 2006). De este modo, y con la finalidad de mejorar la recuperación funcional y el número de axones regenerados, se han probado puentes de pHEMA-co-MMA suplementados con otras matrices, como fibrina, matrigel, etc, o con factores tróficos como el FGF1 y NT-3, donde se observó que, dependiendo del material de relleno utilizado, se favorece la regeneración de unos u otros tractos axonales (Tsai et al., 2006).

Poliuretano: Compuesto apenas estudiado. Se ha propuesto que puede servir para construir puentes con una superficie lisa, buscando una topografía que favorezca el crecimiento longitudinal de los axones (Soldani et al., 1998). En otros trabajos se han construido superficies de poliuretano con texturas alineadas donde se han visto respuestas de crecimiento neurítico alineadas a partir de GRD (Zhang et al., 2005).

Polifosfaceno: Compuesto no tóxico que permite la incorporación de factores promotores del crecimiento. Estudiado en lesiones periféricas, no mejora con respecto a controles realizados a partir de injertos autólogos (Nicoli et al., 2000).

Polifosfoéster (PFE): Los PFE son compuestos biodegradables (Richards et al., 1991) que permiten la incorporación de moléculas en su estructura gracias a los restos de fosfato. Se han utilizado en modelos de lesión periférica, observando que promueven la regeneración y remielinización de axones lesionados (Wang et al., 2001).

Copolímeros de Poliacrilonitrilo/Polivinilcloruro (PAN/PVC): Material probado para fabricar revestimientos destinados a ser rellenos con células de Schwann,

Matrigel con CS, factores neurotróficos, metilprednisolona o glía envolvente de bulbo olfativo. Este polímero semipermeable, aplicado como revestimiento, impide la invasión excesiva de moléculas de matriz extracelular que provienen de células del entorno. Estas cubiertas han permitido a los implantes promover la regeneración de axones propioespinales y sensoriales en lesiones torácicas de médula espinal (Xu et al., 1995; Guest et al., 1997b).

Vidrios biodegradables: Se han utilizado en reparación de nervios periféricos, sin observarse mejoras con respecto a los injertos de músculo utilizados como controles (Lenihan et al., 1998).

Materiales activos eléctricamente: Sobre cultivo, se han conseguido duplicar la extensión de neuritas de las células de línea PC12 sobre polímeros conductores como el polímero de polipirrol (Schmidt et al., 1997). También se ha estimulado la diferenciación de células de línea Nb2a sobre polímeros con cargas, como el copolímero de etileno-propileno fluorado y fluoruro de polivinildieno (Valentini et al., 1993).

Geles de Poli(acrilamidas (PAA) o Poli(hidroxipropilmetacrilamidas (PHPMA): La acrilamida como tal es un compuesto altamente tóxico y que afecta negativamente a las respuestas neuronales a la axotomía (Jones and Cavanagh, 1986). Sin embargo, al mezclar en unas determinadas condiciones la acrilamida con bis-acrilamida, se generan unos geles (PAA) de estructura estable y no tóxica susceptibles de ser utilizados en neuroregeneración. Los geles de PAA se han utilizado mezclados con moléculas de matriz extracelular (MME) generando sustratos de PAA-MME que reúnen unas características que los hacen especialmente idóneos para su uso en ingeniería de tejidos. Entre estas propiedades destaca la posibilidad de: i) un control sistemático y reproducible de la flexibilidad, mediante el control de las concentraciones de acrilamida/bis-acrilamida; ii) permitir la observación de células marcadas con compuestos inmunofluorescentes gracias a sus características ópticas y su grosor; iii) mezclar los geles de PAA con moléculas de matriz extracelular para buscar la adhesión celular, ya que estos geles no muestran interacción detectable con la superficie de las células; iv) la naturaleza porosa de los geles provee a los mismos de una estructura idónea para el cultivo celular; y v) caracterizar las propiedades mecánicas a escalas macro- y microscópicas. Los cambios en las propiedades mecánicas de estos geles, como

la flexibilidad y elasticidad, se ha demostrado que influyen en el comportamiento y adhesión de las células cultivadas sobre ellos, promoviendo la motilidad de células de línea 3T3 (Pelham, Jr. and Wang, 1997; Flanagan et al., 2002) o promoviendo la emisión de ramificaciones de neuronas espinales (Flanagan et al., 2002). Los geles más utilizados en neuroreparación son los PHPMA, bien sea solos o modificados con moléculas de adhesión como péptidos derivados de la fibronectina, sobre los que se ha demostrado que permiten el crecimiento de células gliales, axones, deposición de MME y promueven la angiogénesis (Woerly et al., 1999; Woerly et al., 2001).

Metilcelulosa (MC): Polímero derivado de la celulosa que forma geles en solución acuosa cuando ésta se calienta, debido a interacciones hidrofóbicas entre sus moléculas. Sus propiedades físico-químicas pueden modificarse variando la concentración de MC en la solución, adaptando así las condiciones al modelo de estudio deseado. Se ha comprobado que es biocompatible *in vitro* e *in vivo* al no desencadenar una reacción tisular mayor que los controles (Tate et al., 2001). En modelos de regeneración periféricos, se ha comprobado que la MC, complementada con factores de crecimiento, promueve la regeneración mejor que el colágeno y geles derivados de la laminina (Wells et al., 1997).

1.4.2. Implantes derivados de moléculas biológicas

El desarrollo de la ingeniería de tejidos, sobre todo en lo que se refiere a técnicas de aislamiento de moléculas y de estudio de las propiedades físico-químicas de las distintas sustancias cuando éstas se modifican física o químicamente, ha permitido obtener una gran variedad de sustancias procedentes de moléculas biológicas, principalmente a partir de distintas regiones de algunos organismos, dando lugar a una gran variedad de moléculas que se pueden manipular de multitud de formas para conseguir fabricar implantes que puedan ser utilizados como puentes en reparación nerviosa. El estudio de estas moléculas ha sido uno de los principales objetivos dentro de la ingeniería de tejidos aplicada a reparación neural ya que estas sustancias suelen ser más biocompatibles y biodegradables, adhesivas y, en muchas ocasiones, promotoras del crecimiento axonal y/o celular. Entre los materiales de origen biológico ensayados hasta la fecha para reparación neural se encuentran los siguientes:

Colágeno: El colágeno define una familia de proteínas estructurales de matriz extracelular, caracterizada por una triple hélice formada por tres cadenas peptídicas. Existen más de 20 tipos de colágeno, aunque solo los tipos I, II, III, V, y XI se ensamblan formando fibrillas. El colágeno es uno de los componentes mayoritarios de la matriz extracelular de los tejidos debido a sus propiedades mecánicas y su resistencia a la degradación. Estas, junto a su baja antigenicidad, hacen del colágeno un sustrato ideal para su utilización en ingeniería de tejidos (revisado por Gelse et al., 2003). La utilización del colágeno como sustrato para el crecimiento celular se inició en la década de los cincuenta (Ehrmann and Gey, 1956). Elsdale y Bard cultivaron fibroblastos sobre geles de colágeno bidimensionales (superficies de crecimiento) o embebidos en un sustrato tridimensional, observando que permitía el crecimiento celular y tenía gran influencia sobre su morfología y la manera en la que las células crecen en su superficie (Elsdale and Bard, 1972). Estudios posteriores confirmaron como las superficies construidas con colágeno son un buen sustrato para el crecimiento y adhesión de fibroblastos (Middelkoop et al., 1995; Bessea et al., 2002), neuronas (O'Connor et al., 2001) y para la extensión alineada de neuritas desde ganglios de la raíz dorsal (GRD) (Dubey et al., 1999), estudios en los cuales se llevan a cabo, además, distintas estrategias para conseguir ordenar las fibras del colágeno durante el proceso de gelificación. También es útil como matriz para atrapar células precursoras e inducir su diferenciación (O'Connor et al., 2000).

En modelos de lesión del SNP, el colágeno se ha empleado como puente para su implante en transecciones del nervio ciático o tibial (Keilhoff et al., 2003; Colin and Donoff, 1984), observando que inducían neovascularización y permitían el crecimiento y migración de células de Schwann, promoviendo regeneración. En otros trabajos el colágeno se ha utilizado a modo de filamentos para su implante en secciones del nervio ciático, donde promueve la regeneración y la remielinización (Yoshii and Oka, 2001; Yoshii et al., 2002). En lesiones periféricas también se han construido puentes con las fibras de colágeno alineadas magnéticamente, con la finalidad de conseguir respuestas de crecimiento alineadas (Ceballos et al., 1999). Además de buscar la orientación de las fibras del colágeno o de filamentos del mismo, se ha comprobado que la capacidad de promover la regeneración en las lesiones del SNP depende también de la concentración del gel (Valentini et al., 1987), con resultados óptimos a concentraciones aproximadas a 1,28 mg/ml (Labrador et al., 1998). A concentraciones superiores, las células de Schwann

son incapaces de migrar por el puente y se pierde la capacidad de promover la regeneración. Sin embargo, esos efectos negativos de la concentración revierten cuando el colágeno es suplementando con factores de crecimiento, como el factor de crecimiento glial GGF (Wells et al., 1997; Chen et al., 2001) o con glicosaminoglicanos (Chamberlain et al., 1998). Las propiedades promotoras de la regeneración del colágeno han sido mejoradas mediante la adición de células progenitoras neurales, observando que promovían la neovascularización y que se diferenciaban a células de Schwann con fenotipo no mielinizante (Murakami et al., 2003).

En lesiones del SNC, principalmente en modelos de lesión medular por transección y rizotomía, se ha constatado que el colágeno favorece la neovascularización y genera un ambiente apropiado para la regeneración de los axones centrales (de la Torre, 1982), resultados confirmados posteriormente donde, además, se observó remielinización (Kassar-Duchossoy et al., 2001; Yoshii et al., 2003; Yoshii et al., 2004; Iwata et al., 2006).

Fibrina: La fibrina es el componente principal de los coágulos sanguíneos. Se forma tras la proteólisis del fibrinógeno, una molécula común en el torrente circulatorio. Los monómeros de fibrina se autoensamblan para formar protofibrillas de dos monómeros, agregándose éstas lateralmente, a su vez, para formar paquetes de fibras que se ramifican hasta generar una red a modo de gel. La estructura fibrilar de las matrices de fibrina puede modificarse de varias maneras, por ejemplo variando las concentraciones de trombina (Mosesson and Kaminski, 1990), fibrinógeno, ácido hialurónico (Hayen et al., 1999) u otras proteínas presentes en el medio. Además, influye la concentración de Ca^{2+} del medio (Hardy et al., 1983), de modo que a mayor concentración de Ca^{2+} mayor diámetro adquieren las fibras de fibrina (Herbert et al., 1998), y el pH, orientándose las fibras longitudinalmente a valores de pH alcalinos (Hall et al., 2001).

La fibrina se lleva utilizando mucho tiempo como un excelente adhesivo quirúrgico (Sierra, 1993). Sin embargo, su utilización como agente promotor de la regeneración de nervio periférico lesionado es más reciente y controvertida, porque la fibrina inhibe la adhesión y migración de las células de Schwann, esenciales en el proceso regenerador (Akassoglou et al., 2002; Akassoglou et al., 2003). Estos resultados sugieren la necesidad de modificar la fibrina cuando se plantee su utilización en la reparación de lesiones nerviosas. En estudios *in vitro* los geles de fibrina se han modificado mediante su mezcla

con moléculas promotoras de la adhesión celular, como los péptidos derivados de laminina (p. ej, el péptido RGD) o derivados de N-cadherina, favoreciendo la extensión de neuritas de GRD en geles tridimensionales (Schense and Hubbell, 2000). Resultados similares se vieron al insertar péptidos de unión de la heparina (Sakiyama et al., 1999). Las propiedades diamagnéticas de los monómeros de fibrina permiten, asimismo, orientar magnéticamente sus fibras (Hudry-Clergeon et al., 1983), modificando sus propiedades mecano-estructurales y favoreciendo la extensión de neuritas, algo que no ocurre en los geles isotrópicos o no orientados (Dubey et al., 2001). La modificación de la fibrina introduciendo dominios tipo inmunoglobulina, como la proteína de adhesión L1, promueve la remielinización de neuritas de GRD con respecto a la fibrina sin modificar (Pittier et al., 2005). La fibrina posee, asimismo, propiedades angiogénicas dependientes de la concentración (Nehls and Herrmann, 1996), que pueden ser mejoradas por orientación de las fibras mediante gelificación a pH10 (Hall et al., 2001) o mediante la unión de efrina-2, ya que es un morfógeno vascular (Zisch et al., 2004). En el SNC, la fibrina ha sido utilizada de multitud de formas. Por ejemplo, se ha usado indirectamente como material para adherir puentes contruidos a partir de segmentos de nervio periférico (Cheng and Olson, 1995; Cheng et al., 1996). También se ha utilizado para transportar neurotrofinas como NT-3, BDNF y GDNF, promoviendo la regeneración de raíces dorsales seccionadas, observándose una entrada mayor de axones sensoriales por estos puentes en comparación con los fabricados únicamente con fibrina (Iwaya et al., 1999; Iwakawa et al., 2001). Unido a NT-3, la fibrina se ha utilizado a modo de puentes en lesiones medulares, observando que promovían el crecimiento neurítico y disminuían la reactividad glial de la cicatriz (Taylor et al., 2004; Taylor et al., 2006; Taylor and Sakiyama-Elbert, 2006). Estos estudios sugieren que la fibrina puede ser, además, un buen vehículo para transportar factores promotores de la regeneración. Se ha visto que implantes de fibrina junto con el factor de crecimiento fibroblástico ácido (FGFa), muestran gran eficacia en promover la regeneración de axones centrales corticoespinales en lesiones de médula espinal (Guest et al., 1997a). En modelos de lesión medular en los que el material que une los cabos rostral y caudal de una médula seccionada contienen tubos que se llenan con fibrina y fibrina suplementada con el factor de crecimiento FGF-1, se observó que la regeneración de axones sensoriales disminuyó aunque aumentó la regeneración de axones centrales de las neuronas reticulares, así como el número total de axones (Tsai et al., 2006). Estos resultados han llevado a realizar los primeros estudios

clínicos (Fase I), donde los resultados observados hasta el momento han sido modestos (Wu et al., 2008). Al igual que con el colágeno, la fibrina también se ha utilizado como vehículo para transplantar células troncales neuronales junto con el factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF), observando mejorías con respecto a los controles (Pan et al., 2008). Por lo tanto la fibrina, debidamente modificada, es un buen candidato para su uso en la reparación de lesiones del sistema nervioso, o como vehículo para liberar sustancias que ayuden a este fin.

Fibronectina: La fibronectina es una glicoproteína que media una amplia variedad de interacciones celulares con las moléculas de la matriz extracelular y juega un papel muy importante en adhesión celular, migración, crecimiento y diferenciación. La fibronectina existe formando un dímero de dos subunidades idénticas de unos 250 KDa. Contiene dominios de unión a heparina, colágeno/gelatina y fibrina. Fue descrita inicialmente por Sheppard (Sheppard et al., 1991) en el cerebro en desarrollo, donde la fibronectina, producida por astroblastos media el crecimiento neurítico (Matthiessen et al., 1989). Se comporta como una molécula de adhesión favorecedora del crecimiento. En ingeniería de tejidos, se han desarrollado sustratos de fibronectina con fibras orientadas que estimulan la regeneración axonal en secciones del nervio ciático (Whitworth et al., 1995), incrementando la adhesión y migración de las células de Schwann (Ahmed and Brown, 1999). La fibronectina sirve también como vehículo portador y presentador de factores tróficos, de modo que al estar éstos unidos a ella mejoran sus cualidades promotoras de la regeneración axonal, como ocurre cuando se complementa con NT-3 (Sterne et al., 1997) o con NGF (Whitworth et al., 1996). En lesiones de médula espinal, las matrices de fibronectina, solas o suplementadas con factores de crecimiento, se han mostrado útiles como sustratos promotores de la regeneración axonal (Priestley et al., 2002; King et al., 2003; King et al., 2006). Estos efectos han sido achacados a la mayor migración y adhesión hacia este sustrato de las células de Schwann periféricas.

Matrices basadas en ácido hialurónico: El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano presente en tejidos como el conjuntivo, epitelial y nervioso, donde es componente mayoritario de la matriz extracelular que rodea a células en proliferación y migración durante el desarrollo. Su estructura hidratada forma una matriz que ayuda a los movimientos celulares, esenciales en los procesos de regeneración a través de

puentes. Los puentes de ácido hialurónico han sido ensayados en modelos de lesión de nervio periférico, encontrándose aumento de la regeneración y mejora funcional (Favaro et al., 1990; Wang et al., 1998). Sin embargo, probablemente debido a que estos materiales aceleran la maduración axonal, se observó que, a largo plazo, los axones desaparecían con respecto a los controles (Seckel et al., 1995). Recientemente se han realizado estudios que demuestran la baja toxicidad y buenas propiedades angiogénicas de los geles de ácido hialurónico (Jansen et al., 2004b), proponiéndose como sustrato para la regeneración nerviosa. Con la finalidad de mejorar las propiedades biofísicas de este material, se han modificado su porosidad y viscosidad mediante la unión a poli-D-lisina, aumentando su susceptibilidad a ser invadido por células típicas del sistema nervioso central y disminuyendo la reacción del sistema inmune, hasta niveles similares a los de implantes inertes (Tian et al., 2005a). Además, se han realizado estudios de la unión del ácido hialurónico a anticuerpos como la IgG anti-receptor de Nogo-66, para bloquear los efectos inhibitorios de Nogo-66 (Tian et al., 2005b). Sin embargo, en estudios iniciales en modelos de transección medular, no se ha observado mejoría funcional de los animales, comparado con controles sin puentes de ácido hialurónico entrecruzados con tiol (Horn et al., 2007).

Laminina: La laminina es un componente fundamental de la membrana basal de los tejidos. Funciona como un componente estructural esencial para la morfogénesis, organización y diferenciación celular, procesos mediados por la interacción con receptores tipo integrina. La laminina es una molécula de matriz extracelular altamente promotora de la neuritogénesis (Manthorpe et al., 1983), probada con éxito en modelos *in vivo* de regeneración periférica (Madison et al., 1985; Yoshii et al., 1987; Kaupila et al., 1993). En los estadios iniciales del proceso de regeneración tras lesiones periféricas se ha comprobado que geles de laminina insertados como puentes, aumentan significativamente el rango de axones que pasan a través de la zona de lesión (Madison et al., 1987). Los geles de laminina presentan el mismo problema que el colágeno, no permiten la regeneración periférica a altas concentraciones, probablemente debido a que limitan la migración celular y la difusión de factores promotores del crecimiento (Valentini et al., 1987), estableciéndose una concentración de 4 mg/ml como la óptima para los geles de laminina (Labrador et al., 1998). Estudios en SNP corroboran que la laminina mezclada con otros hidrogeles es más efectiva para promover la regeneración, probablemente porque potencia la adhesión de las células del SNP que favorecen la

misma (Wang et al., 1992; Bailey et al., 1993; Tong et al., 1994; Chen et al., 2000). Geles de laminina como tal no han sido utilizados en lesiones de SNC, sino siempre como complemento de implantes de otros materiales o células.

Matrigel: Es un extracto soluble de membrana basal producido por la línea de células tumorales llamada Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). A temperatura ambiente, gelifica en un hidrogel no poroso. Matrigel se compone de: laminina, colágeno tipo IV, entactina y proteoglicanos tipo heparán sulfato, además de factores de crecimiento solubles como el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF). Los efectos del matrigel sobre la regeneración axonal probablemente están mediados adicionalmente por su permisividad al crecimiento de células promotoras de la regeneración. Se ha comprobado que el matrigel induce la migración y la remielinización por células de Schwann (Carey et al., 1986) y permite la migración y ramificación de células de glía envolvente de bulbo olfativo (Tisay and Key, 1999), lo que promueve el crecimiento de axones. Estos resultados se comprobaron también sobre cultivos de ganglios de la raíz dorsal, observándose que las propiedades neuritogénicas del matrigel se deben probablemente a la migración de células de Schwann (Tonge et al., 1997). También se han comprobado sus propiedades angiogénicas, tanto *in vitro* (Kubota et al., 1988) como *in vivo* (Passaniti et al., 1992). En lesiones de médula espinal el matrigel se ha utilizado principalmente como vehículo para transportar células o factores tróficos, ya que por sí solo no induce ni regeneración ni vascularización. Así, si se complementa con el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), induce el paso de axones corticoespinales y aumento de la neovascularización (Facchiano et al., 2002). Otros trabajos han realizado implantes de matrigel conjuntamente con progenitores celulares del epitelio olfativo humano, observándose regeneración de axones del tracto rubroespinal (Xiao et al., 2005) o con células estromales de médula ósea transfectadas para producir factor de crecimiento derivado de cerebro (BDNF), promoviendo la regeneración axonal con recuperación funcional (Koda et al., 2004; Koda et al., 2007).

Agar: El agar es un polisacárido sin ramificaciones producto de la mezcla de dos polisacáridos, la agarosa y agarpectina, obtenido de la pared celular de varias especies de algas, principalmente de los géneros *Gelidium*, *Euchema* y *Gracillaria*. Cuando está en

solución, a altas temperaturas se encuentra en estado líquido, ya que sus cadenas están desenrolladas y plegadas al azar. Sin embargo, cuando se enfría se producen interacciones en forma de doble hélice entre las cadenas de agarosa, tornándose sólida y formando un gel. El agar como tal ha sido utilizado muy poco en ingeniería de tejidos, salvo para el cultivo de condrocitos en ingeniería de tejidos aplicada a la regeneración del cartílago (Gong et al., 2007) y como superficie de cultivo de neuronas espinales de embrión de rata (Mandys et al., 1991) o para el cultivo de líneas celulares como las 3T3 cuando el agar entrecruzado con gelatina (Verma et al., 2007).

Agarosa: La agarosa es un polímero de α -L-galactosa y β -D-galactosa, obtenida a partir de algas de los géneros *Gelidium* y *Gracillaria*. Es soluble en agua a temperaturas superiores a los 65°C y, dependiendo del grado de sustituciones hidroxietílicas en sus cadenas laterales, gelifica en un rango entre 17 y 40°C. Estudios iniciales mostraron que, cuando se cultivan neuronas en su interior, la morfología y tamaño de poro de la agarosa influyen en la emisión, elongación, organización y dirección de crecimiento de neuritas a través del gel. Se comprobó que las neuronas no pueden emitir neuritas a concentraciones de agarosa superiores a 1.25% (p/v), estableciéndose esta concentración como el umbral superior que permite el crecimiento para neurítico en neuronas incluidas en agarosa (Bellamkonda et al., 1995). En cultivos de ganglios de la raíz dorsal (GRD) se observó que la longitud de las neuritas disminuía a medida que aumentaba la concentración (Dillon et al., 1998). Esto se comprobó en modelos de regeneración periférica *in vivo*, donde la tasa de axones regenerados disminuye a medida que aumenta la concentración de agarosa (con una concentración óptima del 0.5%), probablemente porque se dificulta el paso de los axones y de las células de Schwann que ayudan en el proceso (Labrador et al., 1995). Basándose en la teoría citomecánica de extensión de neuritas de Heidemann y Buxbaum's (Heidemann and Buxbaum, 1994), se ha desarrollado un modelo matemático que predice el rango de extensión de neuritas en geles 3D de agarosa en función de la rigidez mecánica de los mismos, todo ello calculado utilizando cultivos de neuronas de GRD (Balgude et al., 2001). Al igual que con los geles de colágeno y fibrina, la agarosa puede ser modificada con péptidos derivados de moléculas de adhesión como la laminina, para aumentar la proporción de axones que extienden sus neuritas en el interior del gel (Borkenhagen et al., 1998). Estas modificaciones transforman a la agarosa en un sustrato adecuado para la reparación de lesiones del SNC. Con el fin de obtener un sustrato de material estable, que sirviera de

sustrato guía en modelos de lesión de la médula espinal, el grupo de Tuszynski ha desarrollado el método de *congelación-secado* para construir matrices de agarosa con los poros orientados linealmente y que sean susceptibles de cargarse con factores de crecimiento como el NGF (Stokols and Tuszynski, 2004). Aplicando estos sustratos en modelos de lesión medular, este grupo comprobó que los axones crecen a través de los poros orientados, y que la regeneración mejoró cuando la agarosa fue suplementada con factores como el BDNF (Stokols and Tuszynski, 2006).

Alginato: El alginato es un polisacárido natural extraído de algas marrones que se compone de monómeros de β -D-manuronato y α -L-glucuronato. Es un material biocompatible e inmunológicamente inerte (Sennerby et al., 1987), que no es digerido por las células de los mamíferos. Forma un gel en presencia de iones Ca^{2+} y sufre un proceso de degradación física cuando los iones Ca^{2+} se difunden gradualmente fuera del gel provocando que éste pueda ser degradado lentamente y excretado en la orina. Los geles de alginato presentan una estructura porosa cuyo tamaño de poro se encuentra en función de la concentración de alginato. Estos geles permiten una buena adhesión celular sin perder su volumen inicial, comparado con los geles de colágeno que pierden hasta el 40% de su volumen tras ser implantados (Shapiro and Cohen, 1997). Los geles de alginato inducen la neovascularización en modelos de diferenciación de células troncales embrionarias humanas (Gerecht-Nir et al., 2004). El alginato ha sido utilizado con éxito en lesiones del SNP (Suzuki et al., 1999b; Sufan et al., 2001), observándose que permite una excelente migración de células de Schwann y la recuperación del grosor de los axones regenerados, mostrándose más eficaz que los geles de colágeno o de fibrina (Hashimoto et al., 2002). En lesiones de médula espinal de ratas postnatales el alginato induce el crecimiento de axones mielínicos y amielínicos por su interior, induciendo migración de astrocitos y reduciendo la gliosis de los astrocitos reactivos, conduciendo todo ello a procesos de recuperación funcional (Suzuki et al., 1999a; Kataoka et al., 2001; Suzuki et al., 2002). Respecto a este último punto, se ha visto que los astrocitos que migran en los puentes de alginato no segregan lámina basal, lo que ayuda a reducir los componentes de tejido conjuntivo que pudieran representar una barrera a la regeneración (Kataoka et al., 2004). En lesiones en adultos, la mejoría inducida por el alginato en la supervivencia y regeneración pueden complementarse con moléculas de matriz extracelular, como la fibronectina y otros compuestos sintéticos (Novikov et al., 2002), o con factores de crecimiento como el BDNF (Tobias et al., 2001; Tobias et al.,

2005). También se han construido puentes de alginato con sus poros orientados longitudinalmente, comprobando que se inducía un crecimiento orientado de neuritas (Prang et al., 2006).

Gelatina: La gelatina es una proteína que proviene de la hidrólisis del colágeno presente en el tejido conjuntivo de los animales y no existe en ellos de forma natural. Su utilización en reparación nerviosa ha sido mediante la mezcla o entrecruzamiento con otros compuestos. Se ha demostrado que promueve regeneración periférica mezclada con CS (Brown et al., 1996) o entrecruzada con genipina (Chen et al., 2005; Lu et al., 2007).

Quitosano: El quitosano es un término que se refiere a la quitina en distintos estados de desacetilación y despolimerización (**Figura 8**). La quitina es un polímero

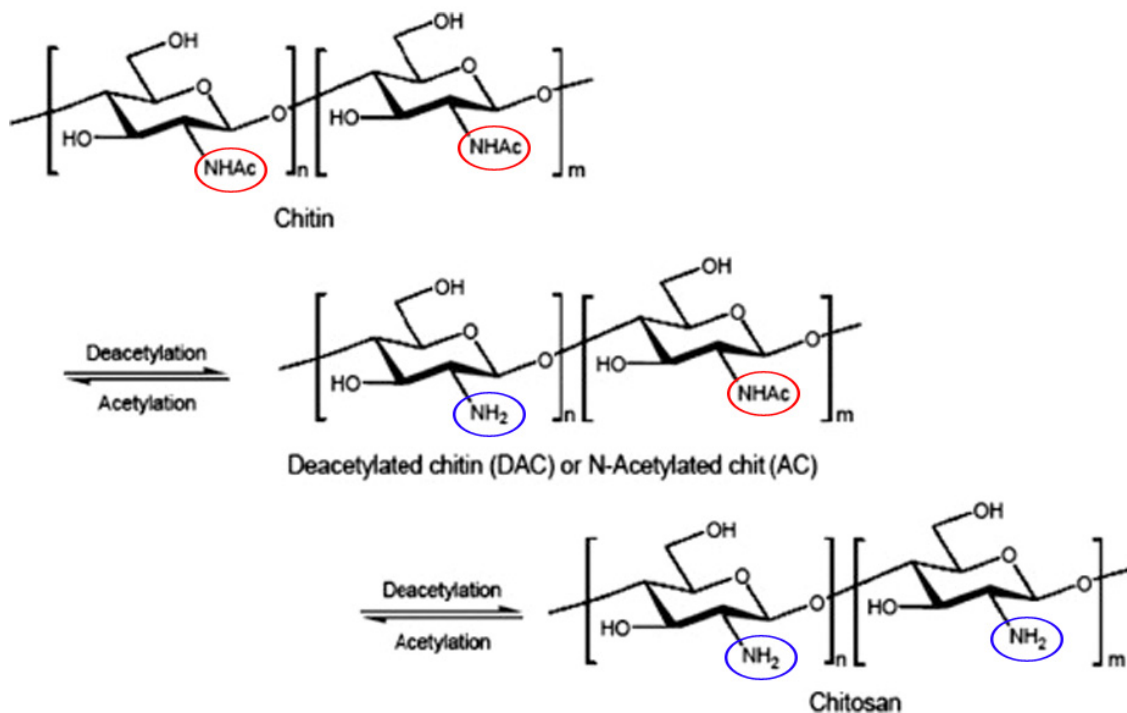


Figura 8: Representación esquemática del proceso de formación del quitosano a partir de la quitina. El proceso se basa en la sustitución de los grupos acetilo (NHAc) de la quitina por grupos amino (NH_2). (Tomado de Hernández R.B. et al; 2008).

estructural natural del exoesqueleto de los artrópodos y de algunos hongos. Se compone de poli-N-acetilglucosamina y β -1,4-glicosidos unidos formando un polímero lineal. Dependiendo del grado de desacetilación de la quitina, se pueden obtener distintos tipos de quitosano con propiedades físico-químicas diferentes. Por ejemplo, a medida que se aumenta el grado de desacetilación, aumenta la estabilidad del quitosano a la degradación, de modo que la quitina y el quitosano desacetilado al 69% son los que se degradan más rápido, no llegando a una semana en implantes subcutáneos en animales (Tomihata and Ikada, 1997). Al ser una sustancia procedente de organismos vivos, el quitosano posee toda una serie de propiedades que lo hacen especialmente útil para su uso en multitud de aplicaciones como la industria textil, cosmética, agrícola y alimentaria, así como en biomedicina. El interés en la utilización del quitosano en ingeniería de tejidos para biomedicina surgió como consecuencia de sus propiedades biológicas de biocompatibilidad, biodegradación, hemostáticas, cicatrizantes, y a su acción antibacteriana y antifúngica (William and Herbert, 1985; Tomihata and Ikada, 1997; Onishi and Machida, 1999; Chenite et al., 2000; Mi et al., 2001; Yuan et al., 2004; Shi et al., 2006) que convierten a esta molécula en un candidato idóneo para ser utilizado en reparación de lesiones del tejido nervioso. La propiedad más interesante del quitosano para ser utilizado en aplicaciones biomédicas surge de su naturaleza policationica. Así, el quitosano es insoluble en soluciones acuosas a $\text{pH} \geq 7$, mientras que cuando el pH desciende de 6, los grupos amino de los azúcares se protonan y hacen que el compuesto comience a ser soluble. Sus características de polication lo hacen especialmente útil para unirlo a una gran variedad de sustancias aniónicas como la celulosa sulfatada (Hamano et al., 1998) o a la heparina (Madihally and Matthew, 1999), dando lugar a toda una serie de estudios para el desarrollo de sistemas que liberen fármacos o para su unión a ADN como terapia génica no viral (Dang and Leong, 2006). Teniendo en cuenta que las superficies cargadas positivamente son promotoras de la adhesión celular, el quitosano o derivados de él han sido utilizados en estudios de reparación de cartílago, por su estímulo de la condrogénesis (Suh and Matthew, 2000) o para fabricar piel artificial (Mao et al., 2003).

Su utilización en regeneración nerviosa comenzó con los trabajos de P.M. Santos, que utilizó tubos de silicona unidos a NGF y laminina, y los rellenó de quitosano, observando un aumento de la angiogénesis tras lesiones del nervio ciático (Santos et al., 1991). Debido a las particularidades de la regeneración nerviosa, el quitosano se ha

modificado con multitud de compuestos para mejorar sus propiedades físico-químicas con el fin de adaptar mejor el material al modelo de estudio. Tras conocer las características físico-químicas de la estructura de los distintos tipos de quitosano, estudiada mediante distintas técnicas espectrofotométricas o de rayos X (Focher et al., 1992), se han realizado modificaciones de la propia estructura del quitosano para observar como varían sus propiedades físico-químicas cuando, por ejemplo, se induce un entrecruzamiento con glutaraldehído, observando la formación de nuevos enlaces y la variación de su microestructura (Monteiro, Jr. and Airolidi, 1999). Las ventajas e inconvenientes del entrecruzamiento del quitosano tanto de forma covalente como de forma iónica han sido analizadas, concluyendo que el entrecruzamiento iónico, aunque produce una estructura menos estable, es más útil para su utilización en biomedicina (Berger et al., 2004). El quitosano ha sido utilizado como molécula para insertar cargas positivas en hidrogeles como la agarosa, mostrando que promovían respuestas adhesivas y extensión neurítica en GRD (Dillon et al., 1998; Dillon et al., 2000). También ha sido modificado con diversos compuestos para mejorar sus propiedades adhesivas, como el polivinil-pirrolidona (Risbud et al., 2000; Risbud et al., 2001), el poli-vinilalcohol (Koyano et al., 1998; Chuang et al., 1999), el ácido poliglicólico, utilizado para reparar lesiones de nervio periférico con grandes cavidades de lesión (Wang et al., 2005; Fan et al., 2008), la laminina (Cao et al., 2005; Matsuda et al., 2005) o péptidos adhesivos de la laminina como YIGSR y IKVAV (Haipeng et al., 2000; Suzuki et al., 2003; Matsuda et al., 2005) y el alginato (Pfister et al., 2007). Sin embargo, entre las mezclas más utilizadas han sido las realizadas con las moléculas biológicas de colágeno, gelatina y poli-L-lisina (PLL). El colágeno interacciona con el quitosano formando enlaces débiles de tipo electrostático (Taravel and Domard, 1993), y se ha comprobado que induce adhesión y extensión neurítica en células PC12 (Cheng et al., 2003a) y que promueve el crecimiento neurítico y migración de CS cuando se utiliza en modelos de regeneración periférica (Gingras et al., 2003). La mezcla con PLL indujo adhesión y emisión neurítica en células PC12 mejor que el colágeno (Cheng et al., 2003a), sobre todo cuando la concentración de PLL en el gel aumentó hasta un 3% en peso (Mingyu et al., 2004). Por último, la gelatina ha sido un compuesto bastante utilizado debido a las propiedades elásticas y aumento de la estabilidad que confiere a la mezcla, mostrándose muy útiles para poder usarse en regeneración nerviosa (Kim et al., 2005b). Se comprobó que, al igual que ocurría con el colágeno, la gelatina establece interacciones de tipo electrostático con el quitosano (Yin

et al., 1999), y que la mezcla de ambos compuestos reduce el número de cargas positivas del quitosano haciendo de ella una superficie más adhesiva, induciendo proliferación de células L929 (Mao et al., 2004). En cualquier caso, la adhesión y emisión neurítica de las mezclas con gelatina mostraron peores resultados que las realizadas con PLL (Haipeng et al., 2000; Cheng et al., 2003b).

Teniendo en cuenta el potencial que presenta el quitosano para construir materiales susceptibles de ser utilizados en reparación nerviosa, y a la vista de los resultados obtenidos hasta la fecha, en este trabajo se han realizado distintas modificaciones del quitosano para construir puentes con unas propiedades físico-químicas y adhesivas óptimas para su implantación en un modelo de lesión medular por transección. Lo primero que estudiamos fue la adhesividad de geles con una concentración de quitosano adecuada a su utilización en la construcción de puentes, evaluando las diferencias que pudieran existir con respecto a concentraciones de quitosano menores y que son utilizadas habitualmente por otros autores. Posteriormente modificamos estos geles con gelatina y PLL de manera similar a lo publicado previamente (Cheng et al., 2003b; Mingyu et al., 2004) para establecer las proporciones de peso óptimas de cada uno de estos compuestos. Con las mezclas elegidas, procedimos a realizar un estudio físico-químico sobre el tipo de interacciones que existieron entre los compuestos y el grado de adhesividad que presentaron con células propias del SNC como los astrocitos y las neuronas, además de estudiar las propiedades promotoras de la neuritogénesis con GRD. Estos estudios nos permitieron elegir la mezcla óptima del quitosano con la gelatina y la PLL para construir puentes que se implantaron en un modelo animal de transección medular en ratas adultas para evaluar los efectos promotores de la regeneración y recuperación funcional.

2.OBJETIVOS

1. Ensayar, mediante estudios *in vitro*, las propiedades adhesivas y promotoras de la proliferación de geles de quitosano al 2%, descritos como adecuados para su uso en la construcción de puentes para reparación nerviosa, comparando su comportamiento con geles al 1% como referencia utilizada en la literatura para realizar estos estudios.
2. Construir superficies de quitosano al 2%, combinado con distintas proporciones de gelatina y poli-L-lisina (PLL), como han descrito Cheng Mingyu y colaboradores, para establecer su influencia en la adhesión y en la promoción de neuritas de células PC12, con respecto a los geles al 1% (Cheng et al., 2003; Mingyu et al., 2004). Establecer las proporciones óptimas de gelatina y PLL en la mezcla con la nueva concentración de quitosano.
3. Modificar el quitosano al 2% con un ratio en peso de gelatina de 0.4 y de PLL de 0.01 para su caracterización físico-química y para establecer, mediante cultivos celulares primarios y ensayos de extensión neurítica con ganglios de la raíz dorsal, la mezcla óptima para construir puentes para su implante en lesiones medulares.
4. Con la mezcla óptima seleccionada, construiremos puentes para su implantación en transecciones medulares torácicas, evaluando, tras 2 meses de supervivencia, el estado de los puentes, los tipos celulares presentes en ellos y la posible regeneración axonal. Se estudiará la recuperación funcional mediante el test BBB de evaluación locomotora en campo abierto. Estudiaremos, además, terapias que combinan la implantación de esos puentes junto con trasplantes de células de glía envolvente de bulbo olfativo.

3.MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ESTUDIOS CON QUITOSANO A CONCENTRACIONES DEL 1 Y 2%

3.1.1. Preparación de las soluciones de quitosano

Se utilizó quitosano con un porcentaje mínimo de desacetilación del 85% (Sigma, C3646; St. Louis, Missouri USA). Este compuesto policatiónico es soluble únicamente en ácidos orgánicos, por lo que las soluciones iniciales de quitosano al 1% y al 2% se prepararon en una solución acuosa de ácido acético (Riedel, 2789; Alemania) 0.2M. Se calentó la solución ácida a 50°C y se añadió poco a poco el quitosano, sometiénolo a agitación fuerte hasta su total disolución. Posteriormente se eliminaron los restos y partículas no disueltas mediante el filtrado a través de una malla con poros de 135µm.

3.1.2. Solidificación del quitosano para formar geles

Se indujo la solidificación del quitosano mediante su precipitación en medio alcalino. Para ello, se añadió cada solución de quitosano a frascos con una solución acuosa de hidróxido sódico (NaOH; Merck, 1.06498; Darmstadt, Alemania) al 3% y se dejó durante 48 horas. El gel formado se lavó bien con agua mili-Q hasta que estuviera neutro. Se tomaron imágenes de los geles con una cámara digital (Nikon, Coolpix 4500).

3.1.3. Estudio de la morfología de los geles de quitosano por microscopía electrónica de barrido ambiental

Los geles se congelaron a -80°C para formar bloques que se liofilizaron en un liofilizador Virtis (modelo BT 3.3 ES), durante 24 horas. El material liofilizado se recortó en pequeños bloques que se metalizaron en un metalizador Polaron SC7640 con una aleación de oro-paladio (80:20) durante 2 minutos y un flujo de gas de 10mA. Se tomaron imágenes de su superficie con un microscopio electrónico de barrido ambiental (Phillips, XL30 ESEM) a una aceleración de voltaje de 10kV.

3.1.4. Fabricación de superficies de crecimiento para cultivos celulares

Se añadieron 100µl de las soluciones ácidas de quitosano al 1 y 2% sobre pozos de placas de 96 pocillos y se eliminaron las burbujas. El material se secó en una estufa a 50°C durante 24 horas para formar láminas. A continuación se indujo la gelificación

añadiendo sobre cada pocillo una solución acuosa de NaOH (Merck, 1.06498; Darmstadt, Alemania) al 1% durante 4 horas. Los restos de NaOH se eliminaron realizando varios lavados con agua mili-Q, hasta que el gel estuviera neutro. Como control positivo se utilizó un grupo de pocillos sin material añadido tratados con una solución acuosa de poli-L-lisina [PLL] (Sigma, P6282; St. Louis, Missouri USA) a 10µg/ml, incubada durante 1 hora a 37°C y haciendo 3 lavados con agua mili-Q para eliminar los restos no adheridos. Finalmente se añadió a todos los pozos 150µl de una solución desinfectante formada por tampón fosfato salino (PBS) + penicilina/estreptomicina (Sigma, P0781; St. Louis, Missouri USA) + gentamicina (Schering-Ploug, 763706; Madrid) a 40µg/ml + amfotericina B (Fungizona; Invitrogen, 15290-026; Carlsbad, CA) a 2.5µg/ml, y se mantuvo en ella un mínimo de 24 horas previo a su uso.

3.1.5. Descongelación y crecimiento de células de las líneas C6 y PC12

Ambos tipos celulares se descongelaron a partir de viales guardados en nitrógeno líquido. La descongelación se llevó a cabo rápidamente a 37°C en DMEM (Gibco, 31053-028; Paisley UK) + 10% Suero Fetal Bovino (Linus, S01805; Madrid), para las C6 y en RPMI1640 (Sigma, R8755; St. Louis, Missouri USA) + 10% suero de caballo (Gibco, 26050088; Paisley UK) + 5% de suero fetal bovino (Linus, S01805; Madrid) para las PC12. Se lavaron dos veces con el medio de cultivo, mediante centrifugaciones a 1000rpm durante 10 minutos y se sembraron sobre placas petri de 90mm de diámetro. Cuando alcanzaron la confluencia se procedió a dar un pase a las células. Para ello, las C6 se levantaron en tampón fosfato-salino (PBS) + Tripsina-EDTA (Sigma, T4174; St. Louis, Missouri USA) incubando 5 minutos a 37°C y las PC12 se levantaron mecánicamente con una pipeta en solución Hanks' sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ (Sigma, H2387; St. Louis, Missouri USA) + EDTA (Merck, 34103; Darmstadt, Alemania) al 0.02%. Finalmente se lavaron con medio de cultivo y se procedió a expandir las células aumentando 4 veces la superficie de crecimiento. Las células se utilizaron cuando se multiplicaban de forma exponencial.

3.1.6. Ensayos de proliferación de células C6 y PC12 basados en MTT

Para estudiar la viabilidad de las células de línea C6 (astroglioma) y PC12 (feocromocitoma) en cada sustrato se realizó un estudio de transformación de MTT. Para ello, se levantaron las células como se indicó en el punto anterior y se resuspendieron en medio de cultivo a razón de 1×10^5 células/ml de medio: DMEM + 10% Suero Fetal

Bovino, para las C6 y RPMI1640 + 10% suero de caballo + 5% de suero fetal bovino + NGF (Sigma, N2513; St. Louis, Missouri USA) a 50ng/ml para las PC12. Las placas se rellenaron con 100µl/pozo de medio con células, realizando una réplica con la misma cantidad de medio sin células, para restar el fondo de MTT que dió cada superficie. Las placas se incubaron en atmósfera protectora a 37°C y 5% de CO₂.

A los días 1 y 4 de su cultivo se procedió a retirar el medio de cultivo y se añadieron 100µl de medio fresco suplementado con MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio] (Sigma, M2128, St. Louis, Missouri USA) a concentración de 1.2mM. Se incubó durante 4 horas en atmósfera protectora a 37°C y 5% de CO₂ para inducir la formación de cristales de formazán que se disolvieron añadiendo a cada pocillo 100µl de una solución de SDS (Fluka, 71725; Buchs, Netherlands) al 10% en HCl 10mM. Las placas se dejaron durante 18 horas a 37°C, y se leyó la absorbancia a 595nm en un lector de placas Multiskan Ascent (Thermo, cat nº 51118300). Previamente a la adición del MTT se procedió a adquirir imágenes del estado de las células a contraste de fases y un aumento de 10X con un microscopio Leica DMI6000 acoplado a una cámara Leica DFC350FX.

3.1.7. Análisis estadístico

Las diferencias entre sustratos y tiempos se estudiaron aplicando un ANOVA de dos vías y realizando posteriormente un test post-hoc de Tuckey. Se empleó el software STATISTICA 7.0.

3.2. MODIFICACIONES DEL QUITOSANO AL 2% MEDIANTE SU MEZCLA CON DISTINTAS PROPORCIONES EN PESO DE GELATINA Y POLI-L-LISINA

3.2.1. Preparación de las soluciones iniciales

Solución de Quitosano 2%: Preparada como se indica en el punto 3.1.1.

Solución de Gelatina al 10%: Se utilizó un tipo de gelatina que tuviese un pH neutro cuando se encuentra en solución. Para ello, se disolvió gelatina tipo B procedente de piel bovina (Sigma, G9391; St. Louis, Missouri USA) en agua mili-Q, ayudando mediante el calentamiento a 60°C y sometiénolo a agitación fuerte.

Solución de Poli-L-lisina (PLL): Se preparó una solución acuosa de PLL (Sigma, P6282; St. Louis, Missouri USA) al 0,2% (2mg/ml).

Solución de Colágeno: Se utilizó una solución comercial de colágeno tipo I de cola de rata (BD Biosciences, 354236; Palo Alto CA) en ácido acético al 0.36%.

3.2.2. Preparación de las mezclas de quitosano + gelatina en distintas proporciones

Las mezclas de *quitosano + gelatina* se prepararon de manera similar a lo publicado previamente por Cheng (Cheng et al., 2003b), pero con una concentración de quitosano del 2%. Las distintas proporciones en peso de la gelatina respecto al quitosano (relaciones de gelatina) se definieron como:

$$r_g = \frac{P_g}{P_g + P_{quit}}$$

[Donde r_g = relación en peso de la gelatina con respecto al quitosano (peso de la gelatina con respecto al de quitosano / 100); P_g = peso de la gelatina; P_{quit} = peso del quitosano].

Teniendo en cuenta el porcentaje en peso de las soluciones de partida de quitosano (2%) y de gelatina (10%), podemos sustituir los pesos por los términos en unidad de volumen:

$$\text{Peso (en g)} = \text{densidad (m/V)} \times V; \quad P = \% \text{ (g/100ml)} \times V \text{ (ml)};$$

$$\text{Peso (en mg)} = \% \times V \times 10$$

$$P_g = \%_g \times V_g \times 10 = 100 V_g$$

$$P_{quit} = \%_{quit} \times V_{quit} \times 10 = 20 V_{quit} \quad \text{de modo que:}$$

$$r_g = \frac{100 V_g}{100 V_g + 20 V_{quit}}$$

A partir de esta fórmula se calcularon los volúmenes de las soluciones de quitosano y de gelatina necesarios para realizar mezclas con relaciones de gelatina (r_g) de 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 (Figura 9).

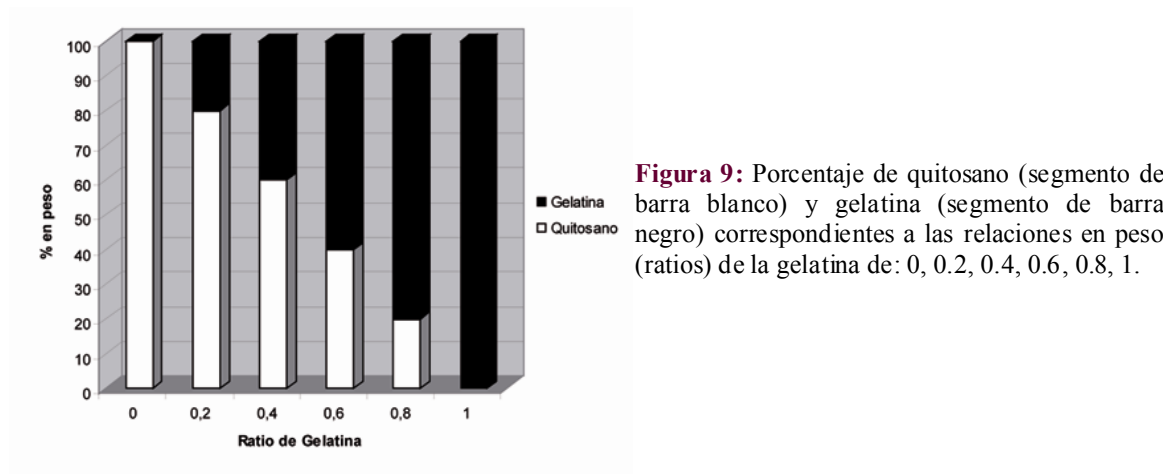


Figura 9: Porcentaje de quitosano (segmento de barra blanco) y gelatina (segmento de barra negro) correspondientes a las relaciones en peso (ratios) de la gelatina de: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.

Las mezclas se hicieron añadiendo el volumen de la solución de gelatina correspondiente a cada r_g sobre el volumen de quitosano, y se sometió a agitación fuerte durante 2 horas a 50°C.

3.2.3. Preparación de las mezclas de *quitosano + poli-L-lisina* en distintas proporciones:

Se mezclaron distintas cantidades de quitosano y poli-L-lisina (PLL) hasta conseguir distintas proporciones (relaciones) en peso de PLL según lo publicado previamente (Mingyu et al., 2004), pero con una solución inicial de quitosano al 2%. Las relaciones en peso de la PLL (r_{pll}) fueron: 0.005, 0.01, 0.02 y 0.03 que se corresponden con unos porcentajes en peso de la PLL de 0.5, 1, 2 y 3. Siguiendo el mismo razonamiento que con la gelatina, se calcularon los volúmenes necesarios para obtener cada r_{pll} a partir de la solución inicial de PLL al 0.2%, según la fórmula:

$$r_{pll} = \frac{P_{pll}}{P_{pll} + P_{quit}} = \frac{2V_{pll}}{2V_{pll} + 20V_{quit}}$$

Una vez calculados los volúmenes necesarios de cada solución para cada r_{PLL} , se añadió la solución de PLL sobre el quitosano y se mezclaron sometiendo a agitación fuerte durante 2 horas a 50°C (Figura 10).

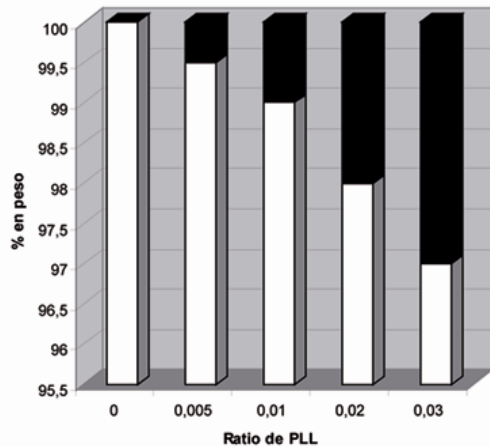


Figura 10: Porcentaje de poli-L-lisina (segmento de barra negro) y de quitosano (segmento de barra blanco) con relaciones en peso de PLL de 0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03.

3.2.4. Fabricación de superficies de *quitosano + gelatina* para cultivos celulares

Se añadieron 300µl de cada mezcla correspondiente a los $r_g = 0$ (quitosano 2%), 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, y 1 (gelatina 10%) sobre pocillos de placas de 24 pozos, hasta completar un total de 4 replicaciones por cada sustrato. Se eliminaron las burbujas y se indujo la formación de superficies mediante secado en estufa a 50°C durante 24 horas. A continuación se indujo la gelificación del quitosano añadiendo una solución acuosa de NaOH (Merck, 106498; Darmstadt, Alemania) al 1% e incubando durante 4 horas a T^a ambiente. Por último los pozos se lavaron varias veces con agua mili-Q hasta que las superficies estuvieran neutras. Estas mezclas se compararon con pocillos control que consistieron en pozos sin sustrato pero pre-tratados con una solución de poli-L-lisina (Sigma, P6282; St. Louis, Missouri USA) a 10µg/ml incubada durante 1 hora a 37°C y lavada varias veces con agua mili-Q. Se realizaron 4 replicaciones por grupo.

Finalmente se añadió a todos los pozos 500µl de una solución desinfectante compuesta de tampón fosfato-salino (PBS) + penicilina/estreptomicina (Sigma, P0781; St. Louis, Missouri USA) + gentamicina (Schering-Plough, 763706; Madrid) a 40µg/ml + amfotericina B (Fungizona; Invitrogen, 15290-026; Carlsbad, CA) a 2.5µg/ml, y se dejó en ella un mínimo de 24 horas previo a su uso.

3.2.5. Fabricación de superficies de *quitosano* + *gelatina* para medidas de humectación

El grado de humectación de un sólido es la capacidad que muestra su superficie para mojarse, lo cual depende de su tensión superficial. Así, si se añade una gota de un determinado líquido sobre una superficie sólida, la tensión superficial de la misma hará que la gota del líquido adquiera una u otra forma. A partir de esta forma se puede obtener una medida, la del *ángulo de contacto*, que se define como el ángulo que forma la tangente de la superficie del líquido y la tangente del sólido. Con el ángulo de contacto se pueden determinar las energías de superficie y la capacidad que tiene la misma para mojarse. Estos parámetros vienen definidos por el grado de hidrofobicidad-hidrofilicidad de la superficie, de modo que el ángulo permite obtener este dato (Johnson and Dettre, 1969; Hiemenz and Rajagopalan, 1997).

Con las mismas soluciones que las empleadas anteriormente ($r_g = 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8$ y 1), se fabricaron superficies sobre placas petri de 35mm de diámetro añadiendo 2ml de cada solución a las placas y dejándolas secar durante 24 horas a 50°C . La gelificación se indujo añadiendo 2ml de una solución de NaOH al 1% durante 4 horas. Se lavó varias veces con agua mili-Q, hasta que estuvo neutro y se secó en estufa a 50°C durante 18 horas. Las bases de las placas se recortaron para formar superficies planas mediante el desgaste de las paredes con una pulidora. Por último, se midió el ángulo de contacto estático de cada superficie con ayuda de un goniómetro de ángulo de contacto (Ramé-Hart INC, model 100-00) tras depositar una gota de agua mili-Q de unos $10\mu\text{l}$ sobre cada superficie. Los datos presentados fueron los valores medios de 3 medidas independientes para cada material.

3.2.6. Fabricación de superficies de *quitosano* + *poli-L-lisina* para cultivos celulares

Se añadieron $300\mu\text{l}$ de cada una de las mezclas realizadas correspondientes a los ratios $r_{\text{PLL}} = 0$ (quitosano 2%), 0.005, 0.01, 0.02 y 0.03 sobre pozos de placas de 24 pocillos. Como control positivo se generaron superficies de colágeno al 0.36%. Una vez rellenados los pozos, los sustratos se secaron en una estufa a 50°C durante 24 horas y se indujo la gelificación del quitosano añadiendo una solución acuosa de NaOH al 1% e incubando durante 4 horas en agitación suave. A continuación se lavó varias veces con agua mili-Q

hasta que el sustrato estuvo neutro. Por último se procedió al entrecruzamiento de las fibras de colágeno sometiendo a éste a irradiación por luz ultravioleta durante 30 minutos. Finalmente se añadieron 500µl de la solución desinfectante indicada anteriormente y se deja en ella al menos 24 horas previo a su uso.

3.2.7. Cultivo y crecimiento de células PC12

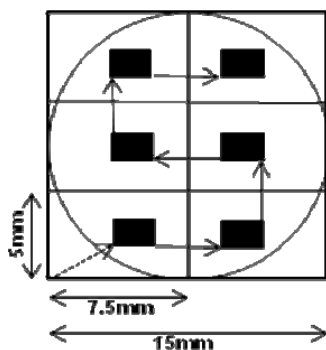
Se utilizaron las mismas células que las descritas en el punto 3.1.5, con la salvedad de que 24 horas antes de su utilización se procedió a inducir su fenotipo neuronal cambiando el medio por medio fresco suplementado con factor de crecimiento nervioso [NGF] (Sigma, N2513; St. Louis, Missouri USA) a 50ng/ml.

3.2.8. Estudios de diferenciación sobre las superficies de *quitosano* + *gelatina*

Las células PC12 se levantaron con solución Hanks' sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} + 0.02% de EDTA, se centrifugaron a 1000rpm durante 10 minutos y se resuspendieron en medio RPMI 1640 para su recuento. Se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron en medio RPMI 1640 + 5% de SFB + NGF (50ng/ml) de modo que la densidad celular por pozo fuese de 1×10^4 células/cm² en 500µl de medio. Los parámetros de estudio se analizaron a los días 1 y 6 de cultivo, según lo descrito por Cheng Mingyu (Cheng et al., 2003b).

Para realizar los cálculos se tomaron 6 imágenes por pozo a cada tiempo, con ayuda de un microscopio Leica DMI6000 acoplado a una cámara digital Leica DFC350FX, y un objetivo de 40 aumentos (400X). La adquisición de las imágenes se hizo realizando un muestreo sistemático uniforme aleatorio, basado en los protocolos descritos por Ronn y Ventimiglia (Ventimiglia et al., 1995; Ronn et al., 2000). En este caso, se generó una cuadrícula virtual por cada pozo (correspondiente a 15 × 15mm para placas de 24) la cual se dividió en 6 cuadrículas idénticas de 7.5 × 5mm. A continuación se midió el tamaño del campo que se visualiza en el microscopio (0.22 × 0.17mm) y se calculó cuantas veces está contenido ese campo en las cuadrículas (34 veces en el *eje x* y 29 veces en el *eje y*). Para obtener imágenes aleatorias en las 6 cuadrículas se determinaron dos números aleatorios para cada eje, que multiplicados por la longitud de cada eje determinaron las veces que se debía mover el campo visual en cada eje. Se situó el campo visual en la esquina inferior izquierda del pocillo y se movió el mando del

manipulador del microscopio hacia la derecha en el *eje x* y hacia arriba en el *eje y* tantos milímetros como resultado se haya obtenido de la anterior operación. De este modo se obtuvo la imagen aleatoria correspondiente al primer campo (inferior-izquierdo). Para obtener las otras 5 imágenes aleatorias, se movió el campo 7,5mm en el *eje x* y 5mm en el *eje y*, según el siguiente esquema:



A cada imagen se le aplicó un disector óptico para evitar sesgar el recuento (Gundersen et al., 1988) y se analizaron tres parámetros:

1. Número de células totales (N);
2. Número de células con neuritas (n);
3. Longitud neurítica (ln): se calculó trazando una línea desde la base de las neuritas saliendo del cuerpo celular hasta la punta de las mismas, siguiendo el recorrido de éstas, sumando al final el valor de todas ellas. Para ello se utilizó el software NIH ImageJ (v 1.39q), calibrando previamente las imágenes.

Con estos datos se calculó el porcentaje de células que presentaban neuritas o índice de diferenciación ($n/N \times 100$) y la longitud neurítica media relativa (ln/n).

3.2.9. Ensayos de adhesión celular sobre las superficies de quitosano + poli-L-lisina

Se levantaron las células PC12 con solución Hanks' sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} + 0.02% de EDTA y se separaron en dos grupos. Se centrifugó a 1000rpm durante 10 minutos y se resuspendió a una densidad celular de 2×10^5 células/ml en medio RPMI 1640 + NGF (50ng/ml) en un caso, y en RPMI 1640 + NGF (50ng/ml) + 5% SFB en el otro caso. Se añadió 1ml de medio + células por pozo y se permitió la adhesión en un incubador a

37°C y 5% de CO₂ durante 4 horas. A continuación se eliminó el medio de cultivo y se lavó con tampón fosfato-salino (PBS) dos veces. Las células se levantaron con una solución de PBS + Tripsina-EDTA (Sigma, T4174; St. Louis, Missouri USA), incubada 10 minutos a 37°C. El efecto de la tripsina se inhibió añadiendo medio con suero a T^a ambiente. Se añadió a las células una solución de Trypan Blue (Sigma, T6146; St. Louis, Missouri USA) al 0.4% (1:9 v/v) y se procedió al recuento de células viables en una cámara de Neubauer con ayuda un microscopio invertido (Nikon, Phase Contrast-2 ELWD 0.3), haciendo al menos 4 recuentos por muestra.

3.2.10. Estudios de diferenciación sobre las superficies de *quitosano* + *poli-L-lisina*

Se procedió de la misma manera que con el estudio de diferenciación en las superficies de *quitosano* + *gelatina*, con la salvedad de que se analizaron los parámetros a los días 1, 3 y 5 de cultivo, siguiendo un protocolo similar al descrito previamente por Cheng Mingyu. (Mingyu et al., 2004).

3.2.11. Análisis estadístico

1. Para el estudio de adhesión de células PC12 sobre las mezclas de *quitosano* + PLL se aplicó un ANOVA de una vía realizando un test post-hoc de Tuckey para muestras no balanceadas.

2- Las diferencias en el % de células con neuritas y la longitud neurítica relativa de los estudios de diferenciación de células PC12 sobre las superficies de quitosano con gelatina y PLL se analizaron aplicando un ANOVA factorial. A continuación se realizó un test post-hoc de Tuckey, para el caso de las mezclas con gelatina, y un test post-hoc de Tuckey para muestras no balanceadas, para el caso de las mezclas con PLL.

3.3. MODIFICACIONES DEL QUITOSANO AL 2% MEDIANTE SU MEZCLA CON GELATINA ($r_g= 0.4$) Y POLI-L-LISINA ($r_{pll}= 0.01$)

3.3.1. Preparación de las soluciones de trabajo

Solución de quitosano al 2%: Preparada como se indica en el punto 3.1.1.

Solución de gelatina al 1.3% (p/v): Se preparó a partir de una solución madre de gelatina al 10%, disolviendo con agua mili-Q. Esta solución se corresponde con el porcentaje de gelatina de la mezcla con $r_g = 0.4$.

Solución de quitosano + gelatina: Se mezcló quitosano con una proporción (relación) en peso de gelatina de 0.4. La mezcla se realizó siguiendo el mismo razonamiento que el descrito anteriormente, en función de la siguiente fórmula:

$$r_g = \frac{P_g}{P_g + P_{quit}} = \frac{100 V_g}{100 V_g + 20 V_{quit}}$$

[Donde r_g = relación en peso de la gelatina con respecto del quitosano; P_g = peso de la gelatina; P_{quit} = peso del quitosano; V_g = volumen de la solución madre de gelatina al 10%; V_{quit} = volumen de la solución inicial de quitosano].

Una vez calculados los volúmenes necesarios, se añadió la gelatina sobre el quitosano y se sometió a agitación fuerte durante 2 horas a 50°C.

Solución de quitosano + poli-L-lisina (PLL): Se preparó una mezcla de quitosano con un ratio en peso de PLL de 0.01. La mezcla se realizó según la fórmula descrita:

$$r_{pll} = \frac{P_{pll}}{P_{pll} + P_{quit}} = \frac{2V_{pll}}{2V_{pll} + 20V_{quit}}$$

[Donde r_{pll} = ratio en peso de la PLL con respecto del quitosano; P_{pll} = peso de la PLL; P_{quit} = peso del quitosano; V_{pll} = volumen de la solución de PLL al 0.2%; V_{quit} = volumen de la solución de quitosano al 2%].

Se añadió el volumen correspondiente de la solución de PLL 0.2% sobre el quitosano y se sometió a agitación fuerte durante 2 horas a 50°C.

Solución de quitosano + gelatina + PLL: Se calculan los volúmenes necesarios de las distintas soluciones a partir de las siguientes fórmulas:

$$r_g = \frac{P_g}{P_g + P_{pll} + P_{quit}} \quad \text{y} \quad r_{pll} = \frac{P_{pll}}{P_{pll} + P_g + P_{quit}}$$

Se sustituyen los pesos por sus términos en unidad de volumen y se calcula cada volumen (V_g y V_{pll}) en función de V_{quit} . Para calcular V_g o bien V_{pll} , se sustituye el valor de cada uno de ellos en la fórmula del contrario, con cada volumen en función de V_{quit} .

Una vez calculados los volúmenes necesarios de cada solución, se añadió sobre el quitosano la gelatina y la PLL y se mantuvo en agitación fuerte durante 2 horas a 50°C.

3.3.2. Gelificación de las distintas soluciones

La gelatina se gelificó mediante enfriamiento, ya que la gelatina utilizada forma geles por debajo de los 40°C. Las soluciones con quitosano se gelificaron mediante la precipitación en medio alcalino. Para ello, se rellenaron frascos de vidrio pequeños con 3ml de una solución acuosa de NaOH (Merck, 1.06498; Darmstadt, Alemania) al 3% y sobre ella se añadieron 6ml de las distintas soluciones líquidas, dejándolo gelificar durante 48 horas. A continuación se procedió a realizar varios lavados con agua mili-Q hasta que el agua estuvo neutra. Se retiró el agua completamente y se congelaron en congelador a -80°C para su liofilización en un liofilizador Virtis modelo BT 3.3 ES durante 24 horas.

3.3.3. Estudio de la morfología de los geles por microscopía electrónica de barrido ambiental

La morfología de los sustratos se estudió con la ayuda de un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM) sobre los distintos geles liofilizados. Para ello, se recortaron pequeños bloques de cada sustrato y se procedió a metalizarlos en un metalizador Polaron SC7640 con una aleación de oro-paladio (80:20) durante 2 minutos con un flujo de corriente de 10mA. Se procedió a tomar imágenes de su superficie en un microscopio electrónico de barrido ambiental (Phillips, XL30 ESEM) a una aceleración de voltaje de 15kV. Se hizo una estimación del tamaño de sus poros haciendo medidas del diámetro máximo interno de los poros con ayuda del software ImageJ v1.39q.

3.3.4. Caracterización físico-química de los geles

3.3.4.1. Medidas del grado de humectación de las superficies

Se realizaron siguiendo el protocolo descrito en el punto 3.2.5. En este caso, se fabricaron superficies con los siguientes sustratos: 1) *quitosano* 2%; 2) *gelatina* 1.3%; 3) *quitosano+gelatina*; 4) *quitosano+PLL*; 5) *quitosano+gelatina+PLL*.

3.3.4.2. Espectrofotometría infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica se basa en la absorción que una muestra experimenta cuando se hace incidir sobre ella un haz de luz infrarroja. Con la técnica FTIR se obtienen *interferogramas* que contienen la absorción completa de la muestra para cada longitud de onda correspondiente al espectro infrarrojo. El grado de absorción de las moléculas depende de las vibraciones moleculares y es específico de cada sustancia. Con ello, se identifican los grupos funcionales (enlaces químicos de la molécula) a partir de unas tablas de correlación donde aparecen las frecuencias en cm^{-1} (**Figura 11**).

ENLACE	TIPO DE VIBRACIÓN	INTERVALO DE FRECUENCIAS ($\nu \text{ cm}^{-1}$)
O-H, N-H	Tensión	3500-3200
C-H, \equiv C-H, Ar-H	Tensión	3300-3000
O-H + C-H (Ácido)	Tensión	3500-2500
CH ₃ , -CH ₂ -, C-H, O=C-H	Tensión	3000-2800
C \equiv C, C \equiv N	Tensión	2400-2100
Procedentes del Ar-H deformación (3-4 bandas)	Vibraciones Secundarias	2000-1650
C=O (ácidos, cetonas, aldehídos, amidas, ésteres)	Tensión	1800-1650
C=C, C=N (alifáticos y aromáticos)	Tensión	1675-1500
N-H	Deformación	1650-1550
C-H	Deformación	1475-1300
C-O (éteres)	Tensión	1300-1100
C-O (ésteres) (2 bandas)	Tensión	1300-1050
C=C-H, Ar-H (fuera del plano)	Deformación	1000-600

Figura 11: Frecuencias de vibración FTIR de los distintos enlaces químicos. Se muestra el tipo de vibración (Tensión o Deformación) y la frecuencia (en cm^{-1}) de los distintos enlaces de las moléculas.

Las medidas se tomaron en un espectrómetro de transformada de Fourier Spectrum Bx FT IR System (Perkin Elmer) equipado con un accesorio de reflexión total atenuada (ATR) a temperatura ambiente. Se tomaron los espectros de absorción entre los 600cm^{-1} y 4000cm^{-1} , usando una resolución de 2cm^{-1} y una adquisición de 1cm^{-1} , grabando 10 barridos para cada espectro y sustrayendo en cada caso el fondo del ambiente. Para ello, se recortaron pequeños fragmentos de cada material liofilizado y se molturaron hasta conseguir granos pequeños. A continuación, se depositó una pequeña cantidad de los sustratos sobre el cristal de diamante del accesorio ATR y se procedió a realizar el barrido de infrarrojos.

3.3.4.3. Espectroscopía RAMAN

La espectroscopía RAMAN (ER) mide la energía que liberan las moléculas de una sustancia cuando se hace incidir sobre ellas un haz de luz monocromática, basándose en el efecto Raman (o dispersión inelástica de un fotón).

Se depositó una pequeña cantidad de cada material sobre un porta de vidrio y se procedió a registrar el espectrograma de luz dispersada Raman en un espectroscopio inVia Raman (Renishaw) acoplado a un microscopio Leica DMLM. Se calibró el espectroscopio con cuarzo (banda muy nítida a 512cm^{-1}) y se hicieron dos barridos de las muestras entre 100 y 4000cm^{-1} con un haz de luz láser monocromático de 785nm con un tiempo de exposición de 10 segundos, 25 acumulaciones y una potencia de láser del 100%, utilizando un objetivo de 50 aumentos.

3.3.4.4. Análisis termogravimétrico

En el análisis termogravimétrico (ATG) se estudia la pérdida en peso de una muestra en función de la temperatura. Este análisis se puede hacer en atmósfera oxidante (aire) o en atmósfera reductora o pobre en oxígeno (atmósfera con 1-5% de O_2 en Nitrógeno). Las pérdidas en peso suelen ser suaves hasta el punto en el que comienza la combustión del mismo, momento en el que se produce una caída brusca del peso. Puede quedar un residuo final que estará constituido por las cenizas inorgánicas del material.

Los ATG se hicieron en un Analizador Termogravimétrico PYRIS 1 TGA (Perkin Elmer) en un rango de temperaturas entre 25°C y 1000°C con aumento de temperatura

de 10°C por minuto. Se añadieron pequeñas cantidades de cada material al cesto del aparato (entre 5-10mg) y se registró la pérdida de peso respecto a la temperatura.

3.3.4.5. Calorimetría diferencial de barrido

Con la calorimetría diferencial de barrido (DSC) se inyecta calor, a velocidad constante, a una muestra encerrada en una cápsula con respecto a una referencia. Se registra el calor agregado a la muestra o a la referencia para mantener ambas a la misma temperatura. En el registro obtenido se obtienen picos positivos, asociados a procesos exotérmicos (normalmente transiciones cristalinas) o negativos, asociados a procesos endotérmicos (procesos de fusión, vaporización, sublimación o desorción).

El estudio calorimétrico se realizó añadiendo 2mg de cada muestra en un calorímetro DSC 7 (Perkin Elmer) en un rango de temperaturas entre 25°C y 400°C con aumentos de T^a de 20°C por minuto. El análisis se realizó sobre cápsula cerrada.

3.3.4.6. Porosimetría por adsorción-desorción de nitrógeno

Con la adsorción de nitrógeno se pueden obtener las propiedades texturales de los sólidos, como es su superficie específica y la presencia de micro y mesoporos. Para ello, se miden las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno (N₂) a la temperatura constante de 77,35°K (-196°C) y se somete a la muestra a distintas presiones para calcular el grado de ocupación de los poros por parte del N₂. Se recortaron pequeños fragmentos de cada material y se sometieron durante 20 horas a su desgasificación en un desgasificador Smart Prep (Micromeritics) para eliminar los gases que pudiera haber en los poros.

La porosimetría se realizó en un equipo volumétrico de adsorción TriStar 3000 (Micromeritics), obteniéndose las isothermas de adsorción-desorción de N₂. Estas isothermas se interpretaron mediante el modelo BET, donde se aplica la ecuación de Brunauer-Emmett-Teller (Brunauer et al., 1938), que en su forma lineal es:

$$\frac{p}{v(p_0-p)} = \frac{1}{v_m c} + \frac{c-1}{v_m c} \frac{p}{p_0}$$

Donde v es el volumen de gas adsorbido (cm^3/g) a la presión p ; p es la presión parcial del N_2 (Pa); p_0 es la presión de saturación (Pa) a la T^a de la isoterma; v_m es el volumen de gas en condiciones normales de T^a y presión (CNTP) requerido para formar una monocapa sobre la superficie; y c es una constante que depende del calor de adsorción. Los términos de la ecuación de la recta son: $y = p/v(p-p_0)$ y la $x = p/p_0$ que son los términos que se conocen para cada punto medido. Una regresión lineal de y sobre x conduce a los valores de la pendiente $b = c-1/v_{mc}$ y de la ordenada en el origen de la recta $a = 1/v_{mc}$. Para asegurar la linealidad se utilizó un rango de presiones que va desde $0,05 < p/p_0 < 1$. De esta fórmula se puede obtener el valor de $v_m = 1/(a + b)$. Con v_m se puede obtener la superficie específica de la muestra (S en m^2/g):

$$S = \frac{v_m s N}{v_0 W}$$

Donde s es el área transversal de cada molécula de N_2 ; N es el número de Avogadro; W es la masa de la muestra; y v_0 es el volumen de un mol de gas ideal en CNTP.

3.3.4.7. Porosimetría por intrusión de mercurio

La técnica de intrusión de mercurio permite caracterizar la porosidad de un material aplicando a éste varios niveles de presión a la muestra inmersa en mercurio (Hg). La presión requerida para introducir el Hg en los poros del material es inversamente proporcional al tamaño de los mismos.

Esta técnica se utilizó únicamente para detección de macroporos, realizando porosimetría de Hg a baja presión en un Autopore II 9215 (Micromeritics). Se recogió una pequeña muestra de cada material y se practicó la porosimetría en un rango de presión de 0.5 a 30 psi, disminuyendo luego hasta los 14 psi (presión atmosférica).

3.3.5. Evaluación de las mezclas en estudios *in vitro*

3.3.5.1. Normativa sobre el uso de animales de experimentación

El uso de animales de este estudio queda reservado a aquellas situaciones en las que sea realmente necesario, garantizando en este caso la mínima intervención compatible

con los objetivos de la investigación y el máximo bienestar posible de los animales, según la directiva de la Unión Europea 86/609/CEE del Consejo Europeo, de 24 de noviembre de 1986.

Todos los animales utilizados en este estudio fueron manipulados con procedimientos sujetos a las normas del comité de ética del Instituto Cajal y a la normativa dictada en el REAL DECRETO 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos y la ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.

3.3.5.2. Gelificación en placas de cultivo para ensayos de MTT

Se prepararon las siguientes superficies de cultivo sobre placas de 96 pocillos (Figura 12):

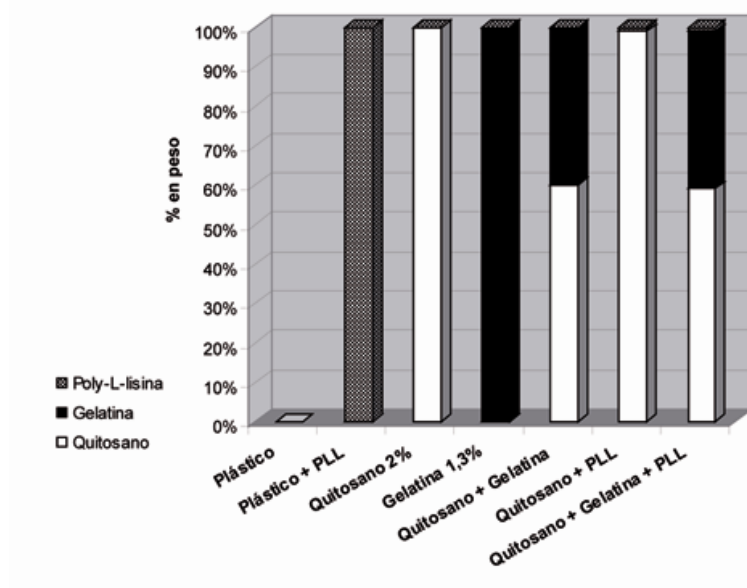


Figura 12: Porcentaje en peso de quitosano (segmento de barra blanco), gelatina (segmento de barra negro) y poli-lisina (segmento de barra a cuadros) en las distintas mezclas de los compuestos.

1. Plástico de los pocillos;
2. Plástico de los pocillos recubiertos con PLL a concentración de 10µg/ml;
3. Quitosano 2%;
4. Gelatina 1.3%;

5. Quitosano + Gelatina ($r_g = 0.4$);
6. Quitosano + PLL ($r_{pll} = 0.01$);
7. Quitosano + Gelatina + PLL ($r_g = 0.4$ y $r_{pll} = 0.01$).

Se realizaron un total de 3 replicaciones por cada material y en un número de placas suficiente para realizar 5 experimentos independientes por cada tipo celular y tiempo. Cada fila de material se hizo por duplicado, con la finalidad de restar el fondo de MTT que pudieran dar los sustratos sin células. Para formar las superficies de los materiales, se añadieron 100µl de las soluciones líquidas por pozo, se eliminaron las burbujas y se dejaron secar en una estufa a 50°C durante 24 horas. Posteriormente, en los pozos con quitosano se indujo la gelificación añadiendo una solución acuosa de NaOH al 1% durante 4 horas. A continuación se eliminaron los restos de NaOH mediante varios lavados con agua mili-Q, hasta que el sustrato estuvo neutro. Por último, los pozos de plástico + PLL se incubaron, durante 1 hora a 37°C con una solución acuosa de PLL a 10µg/ml, lavando varias veces con agua mili-Q para eliminar los restos no adheridos. Los pozos sin biomaterial añadido se consideraron *controles positivos*.

Finalmente se añadió a todos los pozos 150µl de una solución desinfectante formada por tampón fosfato salino (PBS) + penicilina/estreptomicina (Sigma, P0781; St. Louis, Missouri USA) + gentamicina (Schering-Plough, 763706; Madrid) a 40µg/ml + amfotericina B (Fungizona; Invitrogen, 15290-026; Carlsbad, CA) a 2.5µg/ml, y se mantuvo en ella un mínimo de 24 horas previo a su uso.

3.3.5.3. Formación de superficies de gel en placas para cultivos celulares primarios y de ganglios de la raíz dorsal

Se prepararon las mismas superficies de cultivo que las indicadas en el punto anterior, salvo que para estos experimentos las placas fueron de 24 pocillos. Para los estudios inmunocitoquímicos con cultivos primarios y extensión neurítica con ganglios de la raíz dorsal (GRD) se usaron placas de 24, mientras que para los estudios en MEB, previamente se colocaron sobre los pozos unos cuadrados de 1 × 1cm recortados con una serreta a partir de placas petri de 140mm de diámetro (Sterilin, 501V).

Para fabricar las superficies se añadió a los pozos 300µl (para placas solas) o 400µl (para las placas con los cuadrados) de cada solución, se eliminaron las burbujas de aire y

se secaron en una estufa a 50°C durante 24 horas. En los pozos con quitosano se indujo la gelificación añadiendo una solución acuosa de NaOH al 1% durante 4 horas. Los restos de NaOH se eliminaron realizando varios lavados con agua mili-Q hasta que los geles estuvieran neutros. Finalmente se añadió a todos los pozos la solución desinfectante descrita anteriormente y se mantuvieron en ella un mínimo de 24 horas previo a su uso.

3.3.5.4. Cultivo y purificación de células de glía envolvente de bulbo olfativo adultas

Las células de glía envolvente de bulbo olfativo (GEBO) se obtuvieron a partir de 25 ratas macho Wistar de 8 semanas de edad procedentes del animalario del Instituto Cajal (CSIC), siguiendo un protocolo similar al descrito previamente por Graciela Gudiño (Gudino-Cabrera and Nieto-Sampedro, 1996). Los animales se sacrificaron por sobredosis de CO₂ en cámara estanca. A continuación se extrajeron las cabezas de los animales y se introdujeron en un frasco con solución Hanks' con Ca²⁺ y Mg²⁺ (Sigma, H6136; St. Louis, Missouri USA) sobre hielo. En cabina de flujo laminar, se procedió a cortar los huesos del cráneo hasta exponer el cerebro y los bulbos olfativos. Se extrajeron los bulbos olfativos y se colocaron sobre una placa con solución Hanks' con Ca²⁺ y Mg²⁺. Con ayuda de unas pinzas de relojero curvas y otras rectas se eliminaron las meninges y se disecó la sustancia gris (capa de las fibras y glomerular del bulbo olfativo) bajo una lupa Nikon SMZ-1B. El tejido disecado se pasó a un tubo cónico de 15ml con Hanks' sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ (Sigma, H2387, St. Louis, Missouri USA) procediendo a su disgregación con tripsina (Sigma, T4674; St. Louis, Missouri USA) e incubando durante 30 minutos a 37°C. En los últimos 5 minutos de incubación se añadió DNase I (Roche, 1284932; Mannheim, Alemania). La digestión se ayudó sometiendo el tejido a disgregación mecánica mediante pases sucesivos a través de una pipeta Pasteur siliconizada con Sigmacote (Sigma, SL-2; St. Louis, Missouri USA). Las enzimas se inhibieron añadiendo medio de cultivo con suero constituido por DMEM (Gibco, 31053-028; Paisley UK) y DMEM/F12 (Gibco, 11039-021; Paisley UK) mezclados 1:1 (v:v) y suplementado con 10% de suero fetal bovino (Linus S01805, Madrid) y los antibióticos Penicilina/Streptomycin (Sigma, P0781; St. Louis, Missouri USA). Se centrifugó la suspensión durante 5 minutos a 1000rpm y se repitió el lavado. Finalmente se procedió a su cultivo sobre frascos de 25 cm² (2 bulbos cada frasco) previamente tratados con una solución de PLL (Sigma, P6282;

St. Louis, Missouri USA) a 10µg/ml, incubada 1 hora a 37°C. El medio se cambió cada 3 días.

Cuando el cultivo alcanzó la confluencia (8-10 días aproximadamente) se procedió a la inmunopurificación de células de GEBO mediante columnas magnéticas. Para ello, se procedió a hacer 5 conjuntos celulares diferenciados, procedentes cada uno de 5 animales, y se sometieron a procesos de purificación independientes. Las monocapas de células se lavaron dos veces con solución Hanks' sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} , recogiénose las células en tubos cónicos de 15 ml (5 animales por cada tubo) mediante la ayuda de un barredor celular (Sarstedt, 83.1830). Las células se centrifugaron 5 minutos a 1000rpm y se resuspendieron en 1ml de PBS. A esta suspensión se añadió el anticuerpo primario monoclonal dirigido contra el receptor de neurotrofinas de baja afinidad p75 (Chemicon, MAB365; Temecula, CA) y se incubó durante 30 minutos a Tª ambiente. Se centrifugó la suspensión 5 minutos a 1000rpm y se eliminó el exceso de anticuerpo repitiendo el lavado con PBS. Finalmente las células se resuspendieron en 80µl de PBS + BSA (Sigma, A9647; St. Louis, Missouri USA) al 0.5% + EDTA (Merck, 34103; Darmstadt, Alemania) 2mM, y se añadieron 20µl del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con bolas magnéticas (Miltenyi Biotec, 130-048-402, Alemania) incubando durante 15 minutos a 4°C. Se lavaron las células dos veces con la solución de PBS + BSA + EDTA, centrifugando 5 minutos a 1000rpm y se resuspendió en 500µl de esta misma solución. Por otro lado, se preparó el sistema de purificación magnética sujetando una columna de separación (Miltenyi Biotec, 130-042-201) en un soporte magnético (Miltenyi Biotec, 003244) y haciendo pasar a través de ella 1ml de la solución de PBS + BSA + EDTA. A continuación se pasó la suspensión celular a través de la columna y se lavó la misma con 2ml del tampón, para eliminar las células no adheridas y, por lo tanto, no marcadas. Por último se añadió 1ml del tampón y se extrajeron las células ayudándonos del émbolo que trae la columna, poniendo el mismo sobre la columna y haciendo presión sobre él. Se lavaron las células con medio de cultivo dos veces y se procedió a su cultivo sobre 5 placas de 25 cm², tratadas previamente con PLL a 10µg/ml. Las células se mantuvieron en cultivo 3 días previamente a su uso.

3.3.5.5. Cultivo de astrocitos postnatales

Se utilizaron 5 ratas Wistar postnatales con 1 día desde su nacimiento (P1) y se siguió un protocolo similar al descrito previamente por McCarthy (McCarthy and de, 1980). En cabina de flujo laminar horizontal, se procedió a decapitar a los animales y a extraer sus cerebros bajo lupa (Nikon SMZ-1B), situándolos en solución fría de Hanks' con Ca^{2+} y Mg^{2+} (Sigma, H6163; St. Louis, Missouri USA). Con ayuda de unas pinzas de relojero rectas y otras curvas se eliminaron las meninges y se procedió a disecar sus cortezas cerebrales, que se colocaron en otra placa con solución Hanks' sin Ca^{2+} y Mg^{2+} (Sigma, H2387; St. Louis, Missouri USA) + EDTA (Merck, 34103; Darmstadt, Alemania), donde se cortaron en pequeños trozos. Se introdujeron en tubos cónicos de 15 ml (uno por cada animal) y se disgregó el tejido mediante pases sucesivos a través de una pipeta de 1ml. Finalmente se centrifugaron las suspensiones celulares y se resuspendieron en medio de cultivo DMEM/F12 (Gibco, 11039-021; Paisley UK) + 10% Suero Fetal Bovino (Linus S01805; Madrid) + Penicilina/Streptomycin (Sigma, P0781; St. Louis, Missouri USA), sembrando las células en 5 frascos de 75 cm² de superficie previamente tratados con una solución de poli-L-lisina (Sigma, P6282; St. Louis, Missouri USA) a 10µg/ml, donde se incubaron en atmósfera protectora a 37°C y 5% de CO₂. El medio de cultivo de cambió cada 3 días. Tras 12 días en cultivo, se procedió a eliminar del cultivo otros tipos celulares (astrocitos tipo II y microglía) sometiendo los frascos a agitación constante a 280rpm y 37°C durante 18 horas en un agitador G24 (Environmental Incubator Shaker. New Brunswick Scientific CO INC. Edison N.J.). Se descartaron las células que estuvieran en flotación. Las células adheridas se lavaron 3 veces con solución Hanks' sin Ca^{2+} y Mg^{2+} y se procedió a despegarlas en PBS + Tripsina-EDTA (Sigma, T4174; St. Louis, Missouri USA), incubando 5 minutos a 37°C. A continuación se recogieron las células y se inhibió la enzima añadiendo medio de cultivo con suero. Las células se centrifugaron 7 minutos a 1000rpm y se cultivaron en frascos de 75 cm², previamente tratados con una solución de PLL a 10µg/ml, a densidad de 10.000 células/cm² en medio de cultivo DMEM/F12 + 10% SFB + P/S. Se mantuvieron en cultivo hasta que alcanzaron la confluencia, momento en el cual se procedió a su utilización.

3.3.5.6. Cultivo de neuronas de corteza e hipocampo embrionarias

Las neuronas se extrajeron a partir de 5 camadas de embriones de rata Wistar de 17 días de gestación (E17). Para ello, se sacrificaron 5 ratas gestantes por sobredosis de CO₂ y se extrajeron sus embriones sobre una solución fría de Hanks' con Ca²⁺ y Mg²⁺ (Sigma, H6163; St. Louis, Missouri USA), manteniendo separadas sus camadas. En cabina de flujo laminar, se procedió a sacar los embriones del saco vitelino, situándolos sobre una placa petri con PBS frío. Con ayuda de una lupa (Nikon SMZ-1B), se procedió a extraer los cerebros y de ellos se disecaron los hipocampos y las cortezas de los embriones, eliminando cuidadosamente las meninges con ayuda de unas pinzas de relojero rectas. El tejido se cortó en pequeños trozos y se pusieron sobre tubos cónicos de 15 ml con solución Hanks' sin Ca²⁺ y Mg²⁺ (Sigma, H2387; St. Louis, Missouri USA) suplementada con 0.02% de EDTA (Merck, 1.08418; Darmstadt, Alemania), donde se dejaron incubando en un baño a 37°C durante 30 minutos. A continuación se disgregó el tejido mecánicamente con ayuda de pipetas Pasteur siliconizadas con Sigmacote (Sigma, SL-2; St. Louis, Missouri USA). Finalmente, las células se lavaron con medio Neurobasal (Gibco, 12348-017; Paisley UK) y se resuspendieron en medio de cultivo constituido por Neurobasal + B27 (Gibco, 17504-044; Paisley UK) + Glutamax (Gibco, 35050-038; Paisley UK) + Penicilina/Streptomycin (Sigma, P0781; St. Louis, Missouri USA). Se contaron las células y se volvió a centrifugar hasta dejarlas a una densidad de 4×10^5 células/ml separadas en 5 tubos correspondientes a cada camada. Estas células se utilizaron directamente después de su obtención.

3.3.5.7. Ensayos de supervivencia y proliferación basados en MTT

Tanto las células de GEBO como los astrocitos se levantaron de las placas de cultivo eliminando el medio y añadiendo una solución de tampón fosfato-salino (PBS) + Tripsina-EDTA (Sigma, T4174; St. Louis, Missouri USA). La solución con tripsina se incubó durante 5 minutos a 37°C hasta que las células se despegaron completamente. Se recogieron en tubos cónicos de 15ml y se inhibió la enzima añadiendo medio con suero. Se centrifugó a 1000rpm durante 5 minutos y se procedió a contar las células. Se volvió a centrifugar y las células de GEBO se resuspendieron a razón de 1×10^5 células/ml en medio DMEM (Gibco, 31053-028; Paisley UK) + DMEM/F12 (Gibco, 11039-021; Paisley UK) en proporción 1:1 (v:v) + 10% de suero fetal bovino [SFB] (Linus, S01805) +

Penicilina/Streptomicina (Sigma, P0781; St. Louis, Missouri USA). Los astrocitos se resuspendieron en DMEM/F12 + 10% de SFB + P/S, manteniendo cada grupo de células por separado.

Las neuronas se utilizaron directamente tras su disgregación, a la densidad indicada anteriormente de 4×10^5 células/ml.

Los ensayos de proliferación se realizaron añadiendo 100µl de medio con células por cada pozo de las placas de 96, dejando el mismo número de pozos sin células pero con medio para restar el fondo de los materiales. Con cada uno de los 5 grupos celulares independientes se realizaron 5 experimentos (N=5) por cada tipo celular y cada tiempo. Se incubaron las placas en atmósfera protectora a 37°C y 5% de CO₂, cambiando el medio a los 7 días. Los ensayos de proliferación se realizaron a los días 1, 4, 7 y 14 de su cultivo, para lo cual se procedió a retirar el medio de cultivo de cada pozo y se añadieron 100µl de medio fresco suplementado con MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio] (Sigma, M2128; St. Louis, Missouri USA) a concentración de 1.2mM. Se incubó durante 4 horas en atmósfera protectora a 37°C y 5% de CO₂, para inducir la formación de cristales de formazán, y a continuación se añadió a cada pozo 100µl de una solución de SDS (Fluka, 71725; Buchs, Netherlands) al 10% en HCl (Merck, 1.00319; Darmstadt, Alemania) 10mM. Las placas se dejaron durante 18 horas a 37°C, para disolver los cristales de formazán formados, y finalmente se leyó la absorbancia a 595nm en un lector de placas Multiskan Ascent (Thermo, cat nº 51118300).

3.3.5.8. Estudios inmunocitoquímicos de los cultivos primarios

Para inmunocitoquímicas se utilizaron una parte de las células en suspensión obtenidas anteriormente, sembradas sobre las placas de 24 pocillos a razón de 12×10^3 células/cm² para la GEBO, 31×10^3 células/cm² para los astrocitos, y 125×10^3 células/cm² para los dos tipos neuronales en 500µl de medio. Se incubaron en atmósfera protectora a 37°C y 5% de CO₂ durante 1, 4, 7 y 14 días, momento en el cual se procedió a su fijación y a su marcaje con anticuerpos. El medio de cultivo se cambió cada 7 días.

A los tiempos de estudio indicados (1, 4, 7 y 14 días) se procedió a fijar las células con 500µl de una solución de paraformaldehído (Merck, 5005; Darmstadt, Alemania) al 4% en tampón fosfato-salino (PB) 0.1M durante 30 minutos, previa retirada del medio de

cultivo. Se hicieron 3 lavados con PBS de 5 minutos y se incubaron los pozos con 500µl de una solución bloqueante de PBS + suero normal de cabra [NGS] (Gibco, 16210-064; Paisley UK) al 10% + Tritón X-100 (Sigma, X-100; St. Louis, Missouri USA) al 0.2% durante 1 hora a T^a ambiente. Se aspiró el bloqueo y se añadieron 500µl/pozo de solución de PBS + NGS 1% + Tritón X-100 0.2% con los respectivos anticuerpos primarios diluidos 1:1000:

- **Anti receptor de neurotrofinas de baja afinidad p75** (policlonal; Chemicón, AB1554; Temecula, CA) + **anti proteína de unión a Ca²⁺ S100B** (monoclonal; Chemicón, MAB079-1; Temecula, CA). Marcadores utilizados para identificar a las células de GEBO como característicos de ellas.
- **Anti proteína glial fibrilar ácida GFAP** (policlonal; Dako, Z0334; Glostrup, Alemania) + **anti proteína del citoesqueleto Vimentina** (monoclonal; Dako, M0725; Glostrup, Alemania). Marcadores utilizados para identificar astrocitos.
- **Anti neurofilamentos** de los distintos pesos moleculares: alto (200-210 KDa, NF-H), medio (150 KDa, NF-M) y bajo (68-70 KDa, NF-L) (policlonal; Affiniti, NA1297; Exeter, UK) + **anti proteína β-III-tubulina** (monoclonal; Chemicón, CBL-412; Temecula CA). Marcadores utilizados en los cultivos neuronales como marcadores característicos de estas células.

Se incubaron durante toda la noche a 4°C y la fracción no unida se retira haciendo 3 lavados de 5 minutos con PBS. A continuación se añadieron 500µl de PBS con los respectivos anticuerpos secundarios diluidos 1:1000:

- Anti-IgG de ratón hecho en cabra conjugado a Alexa 594 (Molecular Probes, A11005; Leiden, Netherlands) para revelar los anticuerpos monoclonales.
- Anti-IgG de conejo hecho en cabra conjugado a Alexa 488 (Molecular Probes, A11008; Leiden, Netherlands) para revelar los anticuerpos policlonales.

Se incubaron durante 1 hora a T^a ambiente, y se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Por último se incubaron con una solución de bis-benzimida (Hoechst; Sigma B2261; St. Louis, Missouri USA) a 1µg/ml en PBS durante 3 minutos. Se hicieron 3 lavados con PBS y se dejaron con 500µl de PBS. Se tomaron imágenes en un microscopio invertido

Leica DMI6000B acoplado a una cámara Leica DFC350FX con objetivos de 10 y 40 aumentos.

3.3.5.9. Estudio de las células por microscopía electrónica de barrido

Para los estudios por microscopía electrónica de barrido (SEM), se utilizaron únicamente astrocitos y células de GEBO a la misma densidad que la indicada anteriormente. Se añadieron 500µl de medio con células sobre la placa con los cuadraditos de 1×1 cm y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 días, momento en el que se procedió a fijarlas para su tratamiento y estudio al SEM.

Se retiró el medio de cultivo de los pocillos y se fijaron las células con una solución de paraformaldehído (Merck, 5005, Darmstadt, Alemania) al 4% + glutaraldehído (TAAB Laboratories, G002; Berks UK) al 2,5% en PB 0.1M, durante 1 hora a 4°C. Se hicieron tres lavados de 5 minutos con PBS y se postfijaron con una solución de tetróxido de osmio (Merck, 1.24505; Darmstadt, Alemania) al 2% en agua mili-Q durante 1 hora a 4°C. Se lavaron 3 veces durante 10 minutos con agua mili-Q. Las muestras se deshidrataron en alcohol añadiendo a los pozos 500µl de soluciones crecientes de alcohol, desde 50% hasta el alcohol absoluto (>99,9%) (Merck 1.00983.2511, Darmstadt, Alemania), mediante inmersiones de 10 minutos. Una vez deshidratadas, se sacaron los cuadrados de plástico con las células de los pozos y se desecaron mediante punto crítico en un desecador Critic Point Desecator cpd7501 (Quorum Technologies). Al finalizar, las muestras se sometieron a un proceso de metalización con oro puro en un metalizador Sputter Coater SC502 (Fisons Polaron Quorum BioRad) y se procedió a la toma de imágenes en un microscopio electrónico de barrido Phillips XL30 acoplado a un analizador EDAXDX4i con una aceleración de voltaje de 15kv.

3.3.5.10. Ensayos de extensión neurítica con ganglios de la raíz dorsal

Cultivo de ganglios de la raíz dorsal embrionarios

Los ganglios de la raíz dorsal (GRD) se extrajeron a partir de embriones de rata de 15 días de gestación. Para ello se sacrificó una rata Wistar gestante mediante sobredosis de CO₂ y se extrajeron sus embriones sobre una solución fría de Hanks' con Ca²⁺ y Mg²⁺ (Sigma, H6136; St. Louis, Missouri USA). Bajo campana de flujo laminar, se procedió a extraer los embriones de los sacos vitelinos, y se decapitaron a la altura de la flexión

cervical. El embrión se sujetó por sus extremidades sobre una placa con silicona, situando el abdomen hacia arriba. Se abrió el embrión y se limpió de vísceras hasta que se dejó la columna vertebral limpia. Ayudándonos de unas pinzas de relojero curvas se cortaron las vértebras desde la parte más rostral a la caudal del embrión, dejando expuesta la médula sin romper las meninges. Procurando coger la dura y la médula a la altura del bulbo raquídeo, se tiró verticalmente mientras se sostiene abajo la columna con unas pinzas. Las médulas con los GRD se pasaron a una placa con Hanks' con Ca^{2+} y Mg^{2+} en hielo. Con ayuda de unas pinzas rectas, se fueron separando cada uno de los ganglios que se pusieron sobre una placa con medio de cultivo a 4°C. El medio de cultivo empleado fue Neurobasal (Gibco, 12348; Paisley UK) + B27 (Gibco, 17504-044; Paisley UK) + Glutamax (Gibco, 35050-038; Paisley UK) + Penicilina/Streptomycin (Sigma, P0781; St. Louis, Missouri USA). Se seleccionaron para los cultivos aquellos ganglios que tuvieron el tamaño más homogéneo y que no flotaran sobre la placa.

Análisis de la extensión neurítica

Previamente a la colocación de los GRD sobre los sustratos, se añadieron 400µl de medio de cultivo (Neurobasal + B27 + Glutamax + P/S) a cada pozo y se atemperaron a 37°C en un incubador. A continuación, los GRD se cogieron con una pipeta en 10µl de medio y se colocó 1 ganglio por cada pozo, procurando que éste quedara lo más centrado posible. Se realizaron un total de 6 replicaciones por cada sustrato. Se mantuvo el cultivo en atmósfera protectora a 37°C y 5% de CO_2 , y se procedió a analizar el área de extensión neurítica a las 24 y 48 horas. Para ello, se tomaron imágenes del ganglio y de las áreas ocupadas por neuritas con ayuda de un microscopio de contraste de fases Leica DMI6000B acoplado a una cámara Leica DFC350FX con un objetivo de 10X. Se montaron las fotos para reconstruir cada ganglio y se calculó el área de extensión neurítica con ayuda del software ImageJ (v 1.39q), trazando una línea en torno a la zona de extensión neurítica y restándole a la misma el área ocupada por el ganglio, tal y como se muestra en el ejemplo de la **Figura 13**.

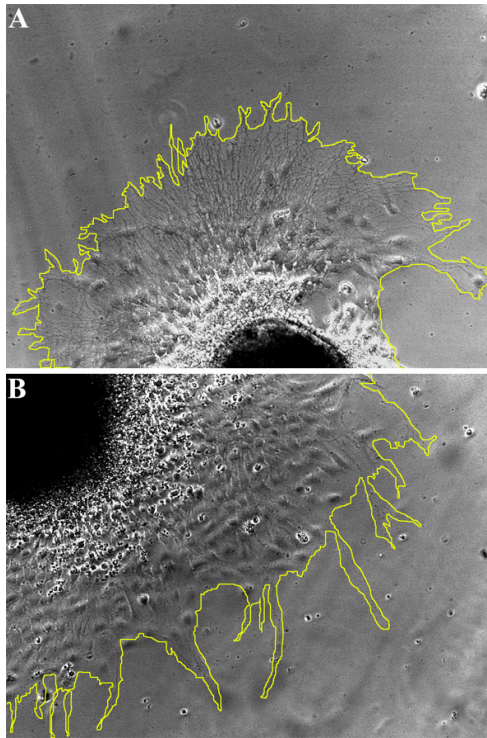


Figura 13: Metodología para el cálculo del área de extensión neurítica de ganglios de la raíz dorsal. Se muestran dos ejemplos de las neuritas de un ganglio en *quitosano + gelatina* (A) y en *plástico + PLL* (B) tras 24 horas y el trazado seguido para calcular el área de ocupación de las neuritas

3.3.6. Puentes de *quitosano + gelatina* y estudios *in vivo*

3.3.6.1. Construcción de puentes de *quitosano + gelatina* con $r_g = 0.4$

Se construyeron puentes de 3mm de diámetro (similar al que tiene la médula en el lugar del implante) con la mezcla de *quitosano+gelatina*. Para ello se añadió la mezcla de *quitosano+gelatina* sobre una placa petri de 35mm en la que previamente se habían añadido 4ml de NaOH al 3% y se dejó gelificar durante 48 horas. Una vez formado el gel, se procede a lavar el material varias veces con agua mili-Q, hasta que el material estuviese neutro, y se procedió a recortar cilindros con ayuda de un trócar para biopsias de 3mm de diámetro (Biopsy Punch, Stiefel). Los cilindros recortados (**Figura 14**) se guardaron en la solución desinfectante anteriormente indicada y se mantuvieron en ella un mínimo de 24 horas previo a su uso en animales.

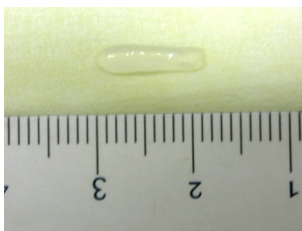


Figura 14: Puente construido con la mezcla de *quitosano + gelatina* recortado con ayuda de un trócar.

3.3.6.2. Marcaje de células de glía envolvente de bulbo olfativo con el colorante vital CFDA-SE:

Con un grupo de células de glía envolvente de bulbo olfativo (GEBO) purificadas con p75 se procedió a realizar un marcaje con el colorante vital previamente a su transplante en los animales lesionados. El colorante utilizado fue la CarboxiFluoresceína Diacetato Succinimidil Ester (CFDA-SE, Molecular Probes, V12883; Leiden, Netherlands). Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 1ml de PBS, donde se añadió 1µl de solución de colorante a 10mM (concentración final a 10µM). Se incubó durante 15 minutos y se centrifugó a 1000rpm durante 5 minutos. Se resuspendieron en medio DMEM (Gibco, 31053-028; Paisley UK) + DMEM/F12 (Gibco, 11039-021; Paisley UK) en proporción 1:1 (v:v) + 10% de suero fetal bovino [SFB] (Linus, S01805) + Penicilina/Streptomycin (Sigma, P0781; St. Louis, Missouri USA) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en medio fresco. A continuación se cultivaron en un frasco de 25cm² previamente tratado con PLL donde se mantuvieron en cultivo 24 horas previo a su utilización en trasplantes.

3.3.6.3. Cirugía de implante de los puentes y trasplantes celulares

Se utilizaron ratas Wistar macho (17 animales) de una edad comprendida entre las 10-12 semanas (250-300g) procedentes del animalario del Instituto Cajal (CSIC). Los animales fueron profundamente anestesiados con pentobarbital (Euta-Lender, Normon, Madrid) a 50mg/kg + clorhidrato de xilacina (Rompún [Bayer], 01263620; Kiel, Alemania) a 3mg/kg y atropina (Braun; Rubí, Barcelona) a 10µg/kg, aplicándoles en los ojos pomada ótica-oftálmica (Farma-Sierra, 759191.7; Madrid). A continuación se rasuró el dorso del animal y se limpió con solución de povidona iodada (Betadine, Viatris Manufacturing; Burdeos, Francia), practicando una incisión en la línea media de unos 5cm de longitud con un bisturí nº11 (Braun, BB511; Tuttlingen, Alemania) que abarcase, aproximadamente, de T5 a L1. Se cortó el tejido conjuntivo y se separaron las capas musculares realizando una disección roma bilateral a las apófisis espinosas hasta llegar a la columna vertebral y se retrajeron los músculos con un retractor quirúrgico. Se limpió con una gubia el músculo la superficie de las vértebras T7, T8 y T9, y se procedió a realizar una laminectomía en la vértebra T8 con ayuda de la gubia, cortando el hueso poco a poco desde una ventana abierta en la región caudal. La columna se suspendió

mediante sujeción en un aparato estereotáxico (Narishige, ST-7) por las vértebras T7 y T9. A continuación, ayudado de una lupa quirúrgica (Zeiss, OPMI 1-FC), se hizo una ventana en la dura, dejando expuesto el segmento medular T9 y se añadieron unas gotas de solución de clorhidrato de tetracaína (1mg/ml) y oxibuprocaina (4mg/ml) (Alon-Cusí, 5-02-023; El Masnou, Barcelona), dejando actuar al anestésico durante 5 minutos. Posteriormente se procedió a cauterizar la arteria espinal anterior con un cauterizador (Aaron M.I., 0698) y se cortó el segmento medular con un bisturí del nº11. La sangre se eliminó con una bomba de aspiración conectada a pipetas Pasteur de vidrio adelgazadas y estériles para después colocar pequeños fragmentos de esponjas de gelatina hemostáticas absorbibles (Espongostán, Altana Pharma, 324442) hasta que cesó el sangrado. Una vez que la cavidad estuvo limpia, se midió el hueco de lesión dejado entre los muñones (en todos los casos en torno a unos 4-5mm de longitud) y se procedió a colocar los puentes recortados con un tamaño acorde a la cavidad dejada, asegurándose de que el puente contactaba con ambos muñones. En este punto se procedió a realizar el trasplante de células de GEBO en uno de los grupos experimentales. Para ello, se procedió a inyectar en el tejido medular 1×10^5 células/muñón. Las inyecciones se realizaron en medio de cultivo sin suero (DMEM/DMEM-F12) con 1×10^5 células/ μ l. Se cargaron 5 μ l de medio + células en una jeringa de 5 μ l (Hamilton 85RN, 32164/00) acoplada a una aguja del Nº34 (Hamilton, ga34/25mm/pst4, 207434/00) y se realizaron dos inyecciones de 1 μ l por muñón a 2mm de distancia desde el extremo del muñón, 300 μ m desde la línea media medular y 800 μ m de profundidad, según el protocolo seguido por Fouad (Fouad et al., 2005). Las inyecciones se realizaron lentamente a razón de 0,5 μ l cada 5 minutos, evitando el reflujo (**Figura 15**). Por último, se procedió al sellado del puente con adhesivo de fibrina (Tissucol-Duo, Baxter, 690511.1; Viena, Austria) y se colocó sobre toda la región de lesión una lámina de esponja de gelatina hemostática (Espongostan) previamente empapada en suero salino fisiológico (Grifols). Se cerró la zona mediante sutura de las capas muscular y conjuntiva con sutura absorbible de ácido poliglicólico (Surgicryl, SMI-AG 1115-1519; Hünningen, Bélgica) y se procedió a cerrar la piel con ayuda de grapas quirúrgicas nº12 (Mitchell, 06-M-3150-12), limpiando la zona exterior con povidona yodada.

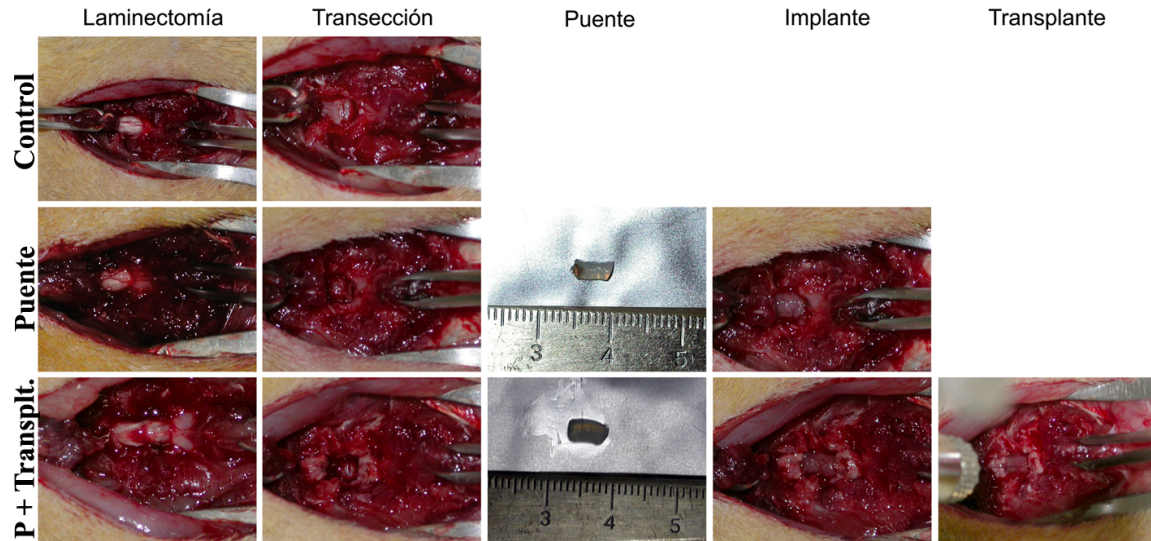


Figura 15: Cirugía de los tres grupos experimentales: 1) control, 2) Puente y 3) Puente + Transplante. Se ilustran los pasos dados en la cirugía: *Laminectomía* para exponer la médula; *Transección* para eliminar el segmento medular T9; recorte de un *punte* a ajustado al hueco de lesión; *Implante* del puente en el espacio de lesión; *Transplante* de células de GEBO en el grupo experimental que recibió células.

Durante los primeros 5 días tras la cirugía se aplicaron cuidados postoperatorios que consistieron en la rehidratación de los animales mediante la inyección subcutánea de 5ml de suero salino fisiológico glucosado (Grifols, 330107; Barcelona), inyección subcutánea del antibiótico enrofloxacin (Baytril, Bayer, 01169225; Kiel, Alemania) a 5mg/kg e inyección intraperitoneal del analgésico y anti-inflamatorio ketorolaco (Droal, Laboratorios VITA 880963) a 300µg/kg. Se facilitó la micción de los animales exprimiendo las vejigas dos veces al día hasta la recuperación del reflejo urinario.

3.3.6.4. Trazado anterógrado del tracto corticoespinal

A los 30 días de realizada la cirugía de implantes de los puentes se procedió a anestesiarse de nuevo a los animales con pentobarbital (Euta-Lender, Normon, Madrid) a 50mg/Kg + clorhidrato de xilacina (Rompún, Bayer, 01263620; Kiel, Alemania) a 3mg/Kg + atropina (Braun; Rubí, Barcelona) a 10µg/ml, aplicando sobre los ojos pomada oftálmica (Farma-Sierra, 759191.7; Madrid).

La cabeza de los animales se sujetó firmemente por vía auditiva en un aparato estereotáxico (Stoelting, 51600), y se limpió la zona a intervenir con povidona yodada. Un corte en la piel con un bisturí nº11 dejó expuesto el cráneo desde los huesos frontales

hasta el occipital. Se retiraron las capas de tejido conjuntivo y periostio y con ayuda de un taladro de dentista (FST 95312) se procedió a abrir una ventana en el cráneo que dejó expuesta las cortezas motoras primaria y secundaria derecha. Se inyectó el trazador Biotina-Dextrano-Amina (BDA) al 10% en PB 0.1M (MW=10.000; Molecular Probes, D1956; Leiden, Netherlands) con ayuda de una jeringa de 5 μ l (Hamilton 85 RN, 32164/00) y agujas No.34 (Hamilton, 207434/00) a lo largo de 12 puntos con una cantidad de 0.3 μ l por punto. Estos puntos se repartieron por la corteza motora 1ª y 2ª de modo que abarcasen las regiones que controlan los músculos flexores del codo, extensores de la muñeca, flexores de los dedos del miembro anterior, flexores de la cadera, extensores del tobillo y extensores de la rodilla, determinados según el mapa cortical descrito por Neafsey (Neafsey et al., 1986). Finalmente se suturó el tejido conjuntivo con sutura absorbible de ácido poliglicólico (Surgicryl, SMI-AG, 1115-1519; Hünning, Alemania) y la piel del cráneo se suturó con hilo de seda de 3/0 (Lorca-Marin, 55159).

Se establecieron los cuidados postoperatorios citados para la cirugía del implante. Los animales fueron sacrificados 4 semanas después de la aplicación del trazador.

3.3.6.5. Estudio funcional de evaluación locomotora en campo abierto mediante la escala BBB

Las pruebas de BBB se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo descrito previamente (Basso et al., 1995). Esta escala, diseñada para un modelo de lesión medular por contusión, subdivide el proceso de recuperación funcional de los miembros posteriores en 21 categorías, repartidas en tres fases: *temprana* (puntuación de 0-7), *media* (8-13) y *tardía* (14-21). En este estudio se adaptó la escala BBB al modelo utilizado de transección medular. Brevemente, el procedimiento consistió en entrenar a los animales durante 10 días en un campo abierto de diámetro 90cm y altura de pared de 18 cm. Una vez realizada la cirugía, se examinó la movilidad de los miembros posteriores de cada animal en el campo abierto, en intervalos de 7 días hasta el día 56 postlesión, grabando los movimientos durante 4 minutos con una cámara JVC DVX4. En cada sesión se rellenaron las hojas de toma de datos (**Figura 16**), asignando cada día el valor de la escala BBB correspondiente en función de los movimientos observados.

Rata #: _____ Fecha: _____ DPO: _____ Puntuación: I _____ D _____

MOVIMIENTO DE LAS EXTREMIDADES			POSICIÓN DEL TRONCO		ABDOMEN	COLOCACIÓN DE LA PATA		PASOS		COORDINACIÓN	LEVANTA LOS DEDOS	POSICIÓN PREDOMINANTE DE LA PATA		ESTABILIDAD DEL TRONCO	RABO
Cadera	Rodilla	Tobillo	Lado	Sostiene el peso		Barra	Colocación Plantar	Dorsales	Plantares			Contacto inicial	Al levantar		
I D	I D	I D	I D	I D	Arrastra	I D	Soporte Ocasional Peso	Soporte Peso	I D	I D	O	O' O'	I I	I I	Arriba
O O	O O	O O			Paralelo		I D	I D	O O	O O	O	O O	E E	E E	
S S	S S	S S	Medio		Alto				F F	F+ F+	F	F'' F''	P P	P P	Abajo
E E	E E	E E							C C	C C	C	C C			

COMENTARIOS: _____

O – Sin movimiento
 S – Movimiento Ligero
 E – Movimiento Extensivo
 O – Nunca 0%
 O – Ocasional ≤50%
 F – Frecuente 51-94%
 C – Constante 95-100%
 * Levantamiento dedos ≤ 5%
 ** Arrastre de los dedos > 4/MP
 † Pasos Dorsales > 4/MP
 I – Rotación Interna
 E – Rotación externa
 P – Paralela

Figura 16: Hoja de toma de datos para los estudios de evaluación locomotora en campo abierto según la escala BBB. La hoja de toma de datos se subdivide en tres regiones: izquierda, donde se anotan los movimientos correspondientes a la fase temprana de recuperación; media, donde se anotan los de la fase media; y derecha, donde se anotan los de la fase tardía. (DPO= días post operación; I= izquierda; D= derecha).

3.3.6.6. Estudios anatómicos

Fijación y preparación del tejido para histología e inmunohistoquímica

A los 60 días de supervivencia de los animales se procedió a la fijación de los tejidos por perfusión intracardíaca. Los animales recibieron una dosis eutanásica del anestésico pentobarbital (Euta-Lender, Normon, Madrid) a 100mg/Kg para inducir una sedación profunda. Una vez anestesiado se procedió a cortar la piel que cubre el pecho del animal para exponer la caja torácica, y se cortó ésta por los laterales, sujetando por el apéndice xifoides del esternón y evitando romper las arterias mamarias. Mientras que el corazón latía, se introdujo una cánula (1mm diámetro interno) por el ventrículo izquierdo hasta que sobresalía aproximadamente 1cm por la aorta, y se fijó la misma sujetando con unas pinzas al corazón. Se conectó la cánula a un catéter y se montó a una bomba peristáltica (MaterFlex, 7518-00) con un flujo constante de 20 ml/min. Se garantizó el flujo de soluciones cortando la aurícula derecha del corazón y se procedió a la perfusión del animal, en primer lugar, con 100ml de una solución salina fisiológica al 0,9% heparinizada con 500 U.I. de heparina (Rovi al 5%; Madrid) y a continuación con una solución de paraformaldehído (Merck, 5005; Darmstadt, Alemania) al 4% en tampón fosfato (PB) 0.1M enfriado previamente a 4°C a razón de 1ml/gramo de peso del animal.

Se controló la fijación correcta del animal asegurando que los espasmos producidos tras el paso del fijador sean uniformes y bilaterales.

Terminada la fijación, se cortó la piel del animal desde el hocico hasta el rabo y se extrajeron el cráneo y la columna vertebral cortando con unas tijeras. Se separó el cráneo de la columna cortando por encima de C1, a nivel de la decusación del TCE y se limpió bien de músculo con una gubia. Se extrajeron el cerebro y la médula cortando los huesos con unos alicates tipo tijera. Para extraer la médula se fueron cortando las vértebras una a una por los laterales, y finalmente se sacó del conducto vertebral levantando con una espátula mientras que se fueron cortando las raíces dorsales con unas microtijeras. Se lavaron con PBS y se protegieron de la congelación mediante su inmersión, durante 5-7 días, en una solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato 0.1M a 4°C. Finalmente el tejido se cubrió con medio de inclusión O.C.T. (Tissue-Tek, 4583) y se congeló a -20°C para formar bloques destinados a ser cortados en un criostato (Leica, CM1900). Las médulas se colocaron de modo que se obtuviesen cortes horizontales de 20µm de espesor, recogiendo series, en unos casos, sobre portas previamente gelatinizados (Gelatina Merck, 1.04078), y en otros casos sobre portas ionizados (SuperFrost Plus, VWR Internacional 631-0108). Los cortes se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Immunohistoquímica y revelado de los marcadores

Las secciones de tejido se hidrataron mediante inmersión de los portas en tampón fosfato-salino (PBS) durante 10 minutos, hasta la total eliminación del medio de inclusión O.C.T., realizando al menos 3 lavados. Se bloquearon las uniones inespecíficas incubando los tejidos 1 hora a Tª ambiente con una solución de suero normal de cabra (NGS) (Gibco, 16210-064; Paisley UK) al 10% en PBS + Tritón X100 (Sigma, X-100; St. Louis, Missouri USA) al 0.2%. A continuación se retiró la solución de bloqueo y se procedió a la incubación con los anticuerpos primarios correspondientes, diluidos 1:1000 en PBS + NGS al 1% + Tritón X100 0.2% durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos 1^{ios} utilizados fueron:

- **Anti- proteína glial fibrilar ácida, GFAP** (Chemicón, MAB3402; Temecula CA), GFAP se empleó fundamentalmente para marcar los astrocitos del sistema nervioso central, principalmente los que forman la cicatriz glial.

- **Anti- proteína glial fibrila ácida, GFAP** (Dako, Z0334; Glostrup, Denmark), utilizado para identificar a los astrocitos del SNC y a las células de Schwann de fenotipo no mielinizante.
- **Anti- receptor de neurotrofinas de baja afinidad, p75** (Chemicon, MAB365; Temecula CA), utilizado para identificar las células de Schwann de fenotipo no mielinizante.
- **Anti- cóctel de neurofilamentos (NF) de alto** (NF-H, 200-210 KDa), **medio** (NF-M, 150 KDa) y **bajo** (NF-L, 68-70 KDa) **peso molecular** (Affiniti, NA1297; Exeter UK), empleado para marcar neuritas, sin distinción de si son axonales o dendríticas.
- **Anti- Neurofilamento 200 (NF200)** (Sigma, N0142; St. Louis, Missouri USA) para marcar la subunidad de neurofilamento de alto peso molecular (200KDa) tanto en su forma fosforilada como desfosforilada. Esta proteína se acumula en los extremos axonales distales que se encuentran en crecimiento (Yabe et al., 2001).
- **Anti-Péptido relacionado con el Gen de la Calcitonina, CGRP** (Amersham Biosciences, RPN1842; San Francisco CA), empleado para detectar la presencia de fibras peptidérgicas, principalmente del tipo nociceptivo.
- **Anti- receptor de células T α/β** (Serotec, MCA453G; Oxford UK), utilizado para marcar linfocitos T activados.
- **Anti- glicoproteína de membrana lisosomal de células mieloides, CD68** (Serotec, MCA341R; Oxford UK), utilizado para marcar células con actividad fagocítica, principalmente las del sistema monocito-macrófago.
- **Anti- NG2** (Chemicon, AB5320; Temecula CA), utilizado para marcar proteoglicanos del tipo condroitín sulfato, inhibitorios de la regeneración axonal.

Con estos anticuerpos se realizaron los siguientes marcajes dobles:

- **GFAP/NF**, utilizado para identificar la presencia de neuritas en la zona, tanto dentro como fuera del tejido medular, y la cicatriz glial formada principalmente por los astrocitos reactivos hipertróficos.
- **GFAP/p75**, empleado para identificar las células de Schwann de fenotipo no mielinizante o las células de GEBO transplantadas.

- **p75/NF**, utilizado para estudiar la asociación de las neuritas presentes en los puentes con células que expresen el receptor p75.
- **CGRP/NF200**, utilizado para identificar la presencia de fibras de nueva generación en los puentes y si éstas son positivas al péptido CGRP, con procedencia de raíces dorsales vecinas.
- **CD68/NG2**, utilizado para identificar células fagocíticas y células que expresaran el proteoglicano inhibitorio de tipo condroitín sulfato NG2.

Los anticuerpos primarios se incubaron en PBS + NGS al 1% + Tritón X100 durante toda la noche a 4°C. Se lavó 3 veces durante 5 minutos con PBS y se incubaron con los siguientes anticuerpos secundarios, diluidos 1:1000 en PBS:

- Anti-IgG de ratón hecho en cabra, conjugado con Alexa 488 (Molecular Probes, A11001; Leiden, Netherlands) para revelar los marcadores monoclonales anti-GFAP, anti-TCR y anti-CD68.
- Anti-IgG de ratón hecho en cabra conjugado a Alexa 594 (Molecular Probes, A11005; Leiden, Netherlands) para revelar los anticuerpos monoclonales anti-GFAP, anti-p75 y anti-NF200.
- Anti-IgG de conejo hecho en cabra conjugado a Alexa 488 (Molecular Probes, A11008; Leiden, Netherlands) para visualizar los marcadores policlonales anti-NF, anti-CGRP y anti-GFAP.
- Anti-IgG de conejo hecho en cabra conjugado a Alexa 594 (Molecular Probes, A11012; Leiden, Netherlands) para revelar anti-NG2.

Se incubaron durante 1 hora a T^a ambiente con los anticuerpos 2^{ios} y se procedió a hacer 3 lavados de 5 minutos con PBS. Por último se incubaron con una solución de bisbenzimidaz (Hoechst, Sigma B2261; St. Louis, Missouri USA) a 1µg/ml durante 1 minuto. Se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se montaron las secciones con una solución de Mowiol (Fluka, 81381; Buchs, Netherlands) al 10% en tampón Tris-Cl.

Revelado del trazador BDA

Se visualizó con el marcaje conjunto contra la proteína glial GFAP. Para ello, se procedió a realizar una inmunohistoquímica de igual modo al descrito en el punto

anterior. El anticuerpo secundario utilizado para visualizar el anticuerpo anti-GFAP fue anti-IgG de ratón, hecho en cabra conjugado a Alexa 488, mientras que el trazador se reveló incubando con streptavidina conjugada con Alexa 568 (Molecular Probes, S11226; Leiden, The Netherlands), ambos durante 2 horas a T^a ambiente. El resto del procedimiento fue igual que el seguido para las otras inmunohistoquímicas.

Tinción histológica con Tricrómico de Mallory con azul de anilina

Se utilizó un kit comercial con las soluciones de los distintos reactivos ya preparadas (Bio-Optica, 04-021822; Milano, Italy). Para ello, se hidrataron las secciones en agua mili-Q haciendo 2 inmersiones de 10 minutos en cubetas para portas. A continuación se pusieron los portas en soportes horizontales y se añadieron sobre las secciones 5 gotas del reactivo A y 5 del reactivo B (soluciones de la hematoxilina de Weigert's) y se dejó teñir durante 10 minutos. El colorante se diferenció lavando en agua corriente durante 10 minutos y se pusieron 10 gotas del reactivo C (solución alcohólica de picrato naranja) y se dejó actuar durante 2 minutos. Se lavó en agua destilada y se añadieron 10 gotas del reactivo D (solución policrómica de Ponceau-Fuchsina) y se dejó actuar durante 1 minuto. Se lavó en agua destilada y se añadieron 10 gotas del reactivo E (solución alcohólica de ácido fosfomolibdico) que se dejó actuar durante 15 minutos. Se lavó con agua destilada y se pusieron 10 gotas del reactivo F (solución de azul de anilina), dejando actuar 1 minuto. Se pasó directamente al alcohol de 50° y se procedió a deshidratar en soluciones crecientes de alcohol (70°-96°-100°), dejando en el último alcohol durante 5 minutos. Se aclaró en xileno mediante 2 inmersiones de 5 minutos y se montó con DEPEX (BDH, 361254D; Poole UK).

Visualización de los marcadores

La visualización y toma de imágenes de los marcadores fluorescentes se realizó con ayuda de un microscopio Leica DMI6000B acoplado a una cámara Leica DFC350FX y con un microscopio confocal Leica TCS SP-5, donde se utilizaron las siguientes líneas focales: 405 para ver el Hoechst (azul); 488 para ver el Alexa 488 (verde); 561 para ver trazador y 594 para ver el Alexa 594 (rojo).

Para el estudio y toma de imágenes de los cortes teñidos histológicamente con tinción Tricrómica de Mallory, se utilizó un microscopio Olympus AX70 acoplado a una cámara digital DP-70.

3.3.7. Análisis estadístico

- 1) El diámetro de los poros medido en las imágenes del ESEM se comparó con un ANOVA de una vía y aplicando un test post-hoc de Tuckey.
- 2) Para los estudios de supervivencia y proliferación basados en MTT se hicieron 4 grupos de comparación: i) neuronas de corteza, ii) neuronas de hipocampo, iii) astrocitos postnatales y iv) células de GEBO, donde se analizaron las diferencias entre los distintos sustratos y a los 4 tiempos de estudio, mediante la aplicación de un ANOVA factorial. A continuación se realizó un test post-hoc de Tuckey (para los astrocitos y la GEBO) o un test post-hoc de Tuckey para muestras no balanceadas (para las neuronas).
- 3) En los estudios de elongación neurítica con los GRD se aplicó un ANOVA de una vía y a continuación un test post-hoc de Tuckey para muestras no balanceadas.
- 4) Para los estudios funcionales de BBB se aplicó un ANOVA factorial y posteriormente se realizó un test post-hoc de Tuckey para muestras no balanceadas.

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIOS CON QUITOSANO A CONCENTRACIONES DEL 1 Y 2%

Esta primera parte del trabajo se dirigió a realizar estudios *in vitro* de superficies de quitosano al 2%, que suponen la concentración adecuada para la construcción de puentes para su uso en reparación de lesiones del sistema nervioso, comparado con los estudios realizados por diversos autores con una concentración de quitosano al 1%. Hasta la fecha se han publicado trabajos donde la concentración de partida del quitosano para su uso en cultivos varía desde el 0.5% (Huang et al., 2006), al 0.8% (Crompton et al., 2007), 1% (Haipeng et al., 2000; Mingyu et al., 2004) y hasta el 3% (Freier et al., 2005). Sin embargo, cuando se desea construir tubos para su utilización en reparación nerviosa, las concentraciones inferiores al 1% no son viables debido a la baja consistencia que adquieren los geles, siendo las concentraciones superiores al 1% las más idóneas (Madhally and Matthew, 1999; Wang et al., 2007).

4.1.1. Morfología de los geles de quitosano al 1 y 2%

El análisis de la morfología en el ESEM revela que ambos geles presentan una estructura porosa similar (**Figura 17**). En ambos casos el quitosano forma paredes a modo de láminas superpuestas las cuales forman el espacio poroso. Estas láminas se unen entre sí a través de pequeñas trabéculas que se disponen irregularmente sobre la estructura laminar principal. Se puede observar también la deposición de pequeños grumos y fibrillas sobre las paredes principales del material que podrían corresponderse con distintos compuestos presentes en el quitosano, como trazas de quitina. Estas paredes forman el espacio poroso de los geles, los cuales dejan espacios que superan en muchos casos las 100µm de diámetro, lo que garantiza, en caso de ser utilizado como implante en reparación nerviosa, la posibilidad de ser invadido por células y la entrada y salida de nutrientes y productos de desecho.

Aunque la morfología al microscopio electrónico de los geles al 1 y 2% es similar, la consistencia de ambos geles es muy diferente. En la **Figura 18** se observa que los geles preparados a partir de la solución al 1% presentan una baja consistencia, lo que los convierte en prácticamente inservibles para construir puentes. Sin embargo, cuando la solución de partida es al 2%, el gel se convierte en una estructura mucho más compacta

y moldeable, a partir de la cual se pueden fabricar estructuras tridimensionales para su uso en ingeniería de tejidos.

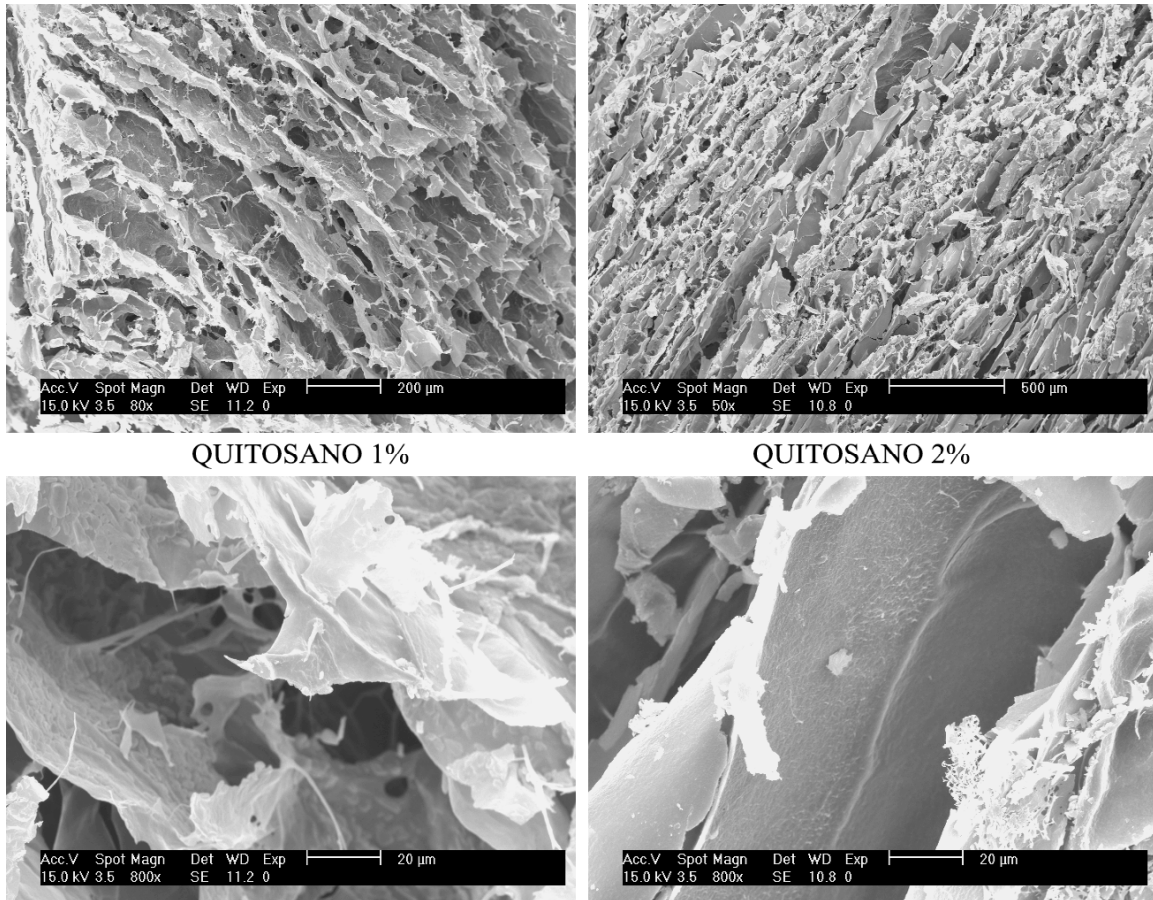


Figura 17: Geles de quitosano al 1% y 2% en imágenes al microscopio electrónico de barrido ambiental. Se observa una morfología similar, con paredes porosas alineadas entre las cuales se ven depósitos del material formando trabéculas. (Arriba, barra de 200μm para el quitosano 1% y de 500μm para el quitosano 2%. Abajo, barras de 20μm).

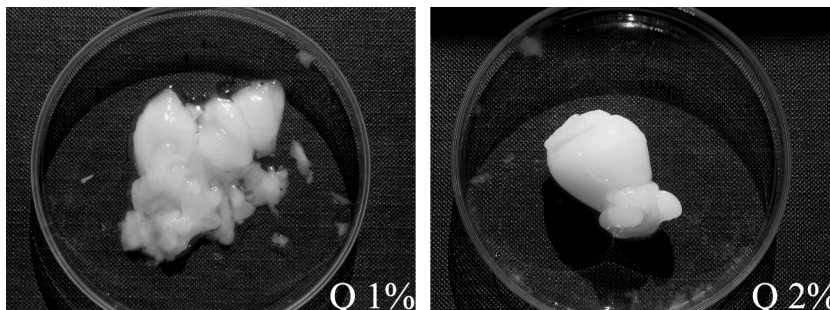
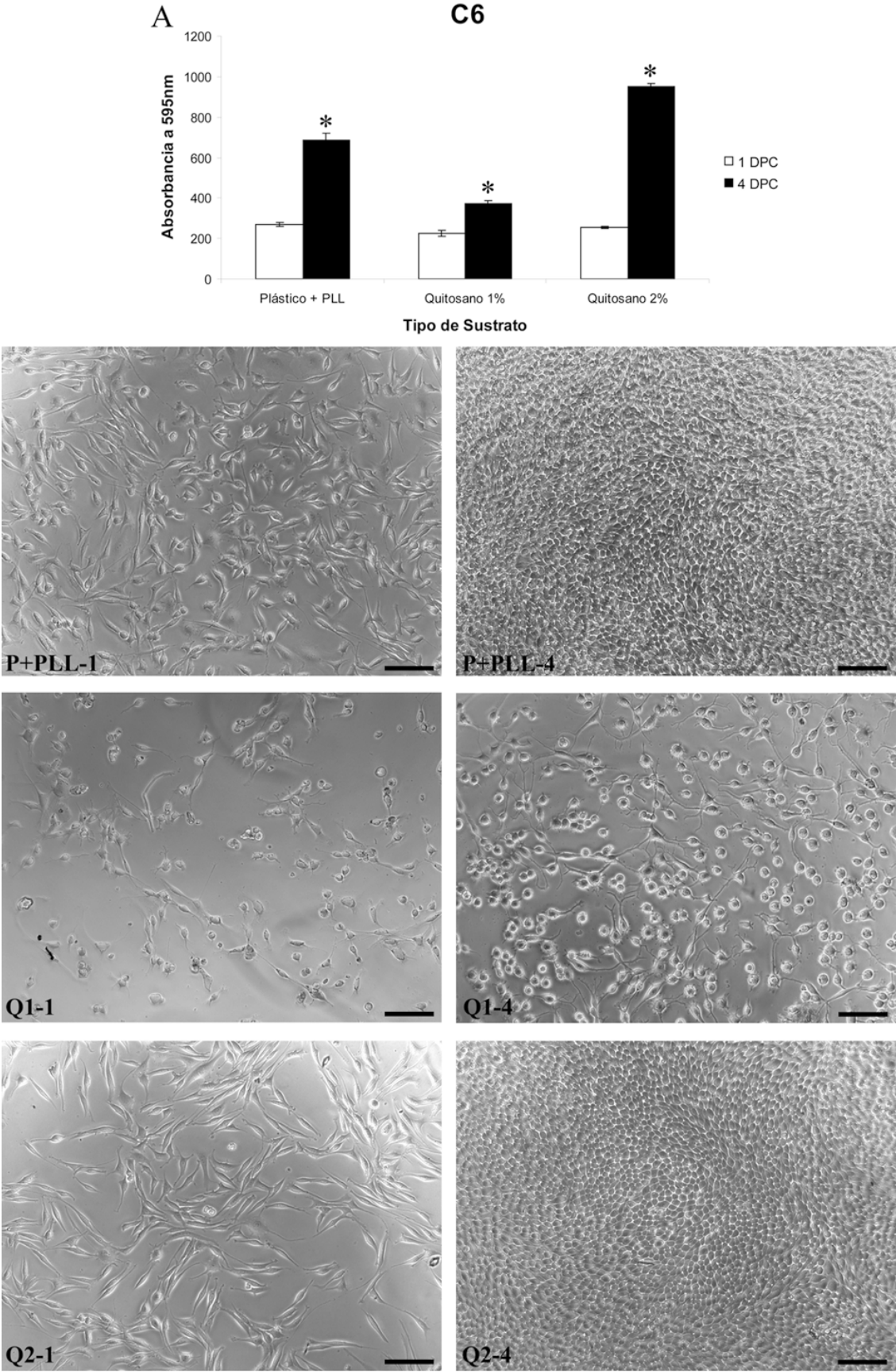


Figura 18: Geles de quitosano al 1% (Q1%) y 2% (Q2%). El gel preparado a partir de la solución al 2% presentó una consistencia mayor a la del gel preparado desde la solución de al 1%.

4.1.2. Ensayos de supervivencia y proliferación de las líneas celulares C6 y PC12 basados en MTT

Una vez conocida la morfología y consistencia de cada gel, se completó el estudio realizando ensayos de supervivencia y proliferación de líneas celulares con fenotipo glial (C6) y neuronal (PC12), sobre estas superficies tras 1 y 4 días en cultivo.

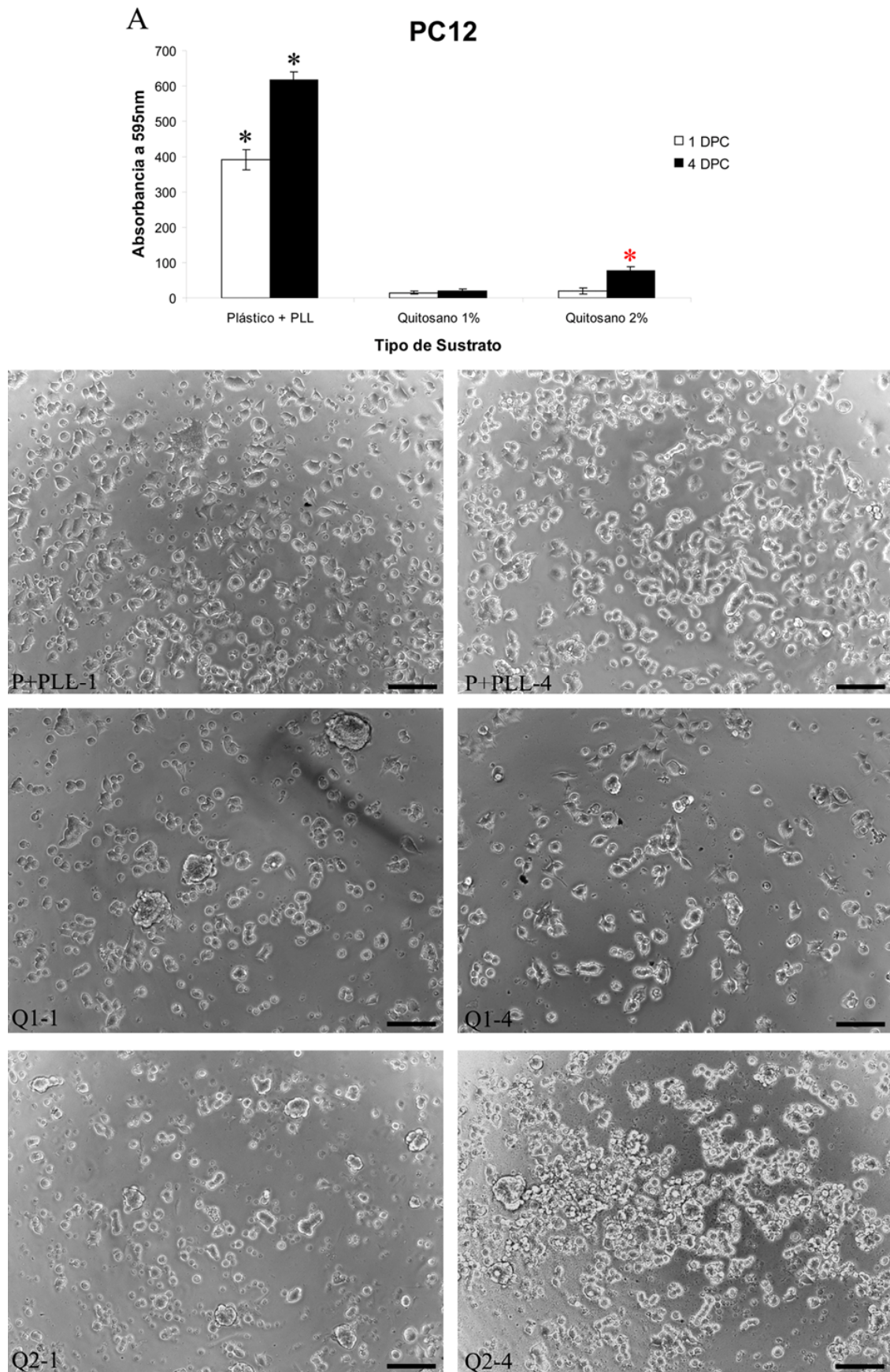
En las células C6, el estudio estadístico mostró que el tiempo de cultivo tuvo un efecto sobre su actividad metabólica, aumentando significativamente ($F(1,36)= 977.64$; $p<0.01$) entre los días 1 y 4 de cultivo. En el primer día de cultivo no se observaron diferencias significativas de actividad metabólica entre las tres superficies estudiadas (control positivo en plástico + PLL y las dos de quitosano), siendo similar en todas ellas (**Figura 19A**). En las superficies control y en las de quitosano 2% la adhesividad celular fue similar, con multitud de células con morfología fusiforme (**Figura 19 P+PLL-1 y Q2-1**). Sin embargo, en los pocillos con superficies de quitosano al 1%, el número de células fue aparentemente menor, aunque su actividad metabólica fue similar al resto, indicando una actividad metabólica/celular superior (**Figura 19Q1-1**). Tras 4 días en cultivo se produjo un aumento significativo ($p<0.01$) de los valores en las tres superficies con respecto a los datos del día 1, indicando que hubo proliferación en todos ellos (**Figura 19A**). En este tiempo se observaron diferencias significativas ($p<0.01$) entre las tres superficies, con los valores más altos en quitosano 2% los más altos, seguidos de la superficie control y por último las de quitosano 1%. Las superficies de quitosano 2% fueron las que mejor promovieron la adhesión y proliferación de células C6, incluso mejor que las superficies consideradas control positivo de crecimiento, mientras que las de quitosano 1% fueron las menos permisivas. Estos datos se reflejan en la imagen, donde se observa como en las superficies de quitosano 2% (**Figura 19Q2-4**) y en las control de plástico + PLL (**Figura 19P+PLL-4**) las células llegaron a ocupar la totalidad de la superficie de cultivo, mientras que en el quitosano 1% (**Figura 19Q1-4**) se observó aumento de la densidad celular pero no ocupación completa de las superficies.



El comportamiento de las células PC12, sin embargo, fue completamente distinto. En este caso ambas superficies de quitosano se comportaron significativamente peor que los controles positivos de crecimiento (plástico + PLL), indicando que el quitosano, tanto al 1 como al 2% inhibe la adhesión de células PC12 (**Figura 20**). En este caso también se observó un aumento de los valores entre los días 1 y 4 del cultivo, aunque el aumento fue significativo ($p < 0.01$) solamente sobre las superficies control (**Figura 20A**). El ensayo se hizo en presencia de la neurotrofina NGF, que detiene la división celular y promueve la diferenciación de las PC12 hacia fenotipo neuronal, por lo que los aumentos de los valores de MTT registrados en los pocillos control se atribuyeron a aumentos en la actividad metabólica de las células. Entre las superficies de quitosano al 1 y 2% no se vieron diferencias significativas entre los valores a los 4 días de cultivo. Sin embargo, los valores más altos se correspondieron con la superficie de quitosano 2%. Por ello, y como consecuencia de las diferencias tan grandes en cuanto a adhesividad y actividad metabólica con respecto al control, se compararon los valores de las dos superficies de quitosano sin los controles. En este caso, se observaron diferencias significativas tras 4 días ($p < 0.01$) entre los valores sobre quitosano al 2% con respecto a los del 1%, indicando que el quitosano 2% se comportó mucho mejor que el polímero al 1% (**Figura 20A, asterisco rojo**).

En base a estos resultados, concluimos que los geles construidos a partir de una solución de quitosano al 2% promueven más y mejor la adherencia y proliferación celular que los geles de quitosano 1%, lo que, unido a su consistencia idónea y a su estructura porosa adecuada, lo convierten en el candidato ideal para su manipulación y utilización en ingeniería de tejidos para reparación del sistema nervioso central.

Figura 19: Ensayos de proliferación de células de línea C6 sobre superficies de quitosano al 1 y 2%. El estudio se realizó comparando las dos superficies de quitosano con una control de plástico + PLL, a los días 1 (barras blancas) y 4 (barras negras) de su cultivo (A). Se muestra un aumento significativo de la proliferación celular entre los días 1 y 4 en todas las superficies de cultivo, además de diferencias entre las superficies a los 4 días de cultivo, con un óptimo en el quitosano al 2%. (Representación de la media \pm error estándar de 7 replicaciones). Abajo, imágenes representativas de las células sobre los pozos en las tres superficies de crecimiento: Plástico + PLL (P+PLL), quitosano 1% (Q1) y quitosano 2% (Q2) a los dos tiempos de cultivo: 1 día (-1) y 4 días (-4). Se observa que tras 4 días las células C6 ocuparon la totalidad del fondo de los pocillos en las superficies de plástico + PLL (P+PLL-4) y en las de quitosano 2% (Q2-4), mientras que en las superficies de quitosano 1% las células no ocuparon todo el fondo aunque emitieron procesos celulares largos (Q1-4). (Barras: 100 μ m)



4.2. MODIFICACIONES DEL QUITOSANO 2% MEDIANTE SU MEZCLA CON DISTINTAS PROPORCIONES DE GELATINA Y POLI-L-LISINA Y EFECTOS SOBRE CÉLULAS PC12

4.2.1. Medidas del grado de humectación en superficies de *quitosano + gelatina*

Se sabe que las células se adhieren mejor a superficies hidrofílicas, como aquellas con grupos hidroxilo y carboxilo (Curtis et al., 1983; Owens et al., 1988; Margel et al., 1993), y que las medidas de ángulo de contacto permiten evaluar la calidad de una superficie de crecimiento con respecto a la adhesión celular. Ángulos de contacto inferiores a 65° presentan un grado de hidrofiliidad promotor de la adhesión celular (Vogler, 1988; Vogler, 1999; Liu et al., 2007). En otros trabajos se ha comprobado que la adhesión celular mejora cuanto menor sea el ángulo de contacto, es decir, cuanto más hidrofílica sea la superficie (Grinnell and Feld, 1982; van Wachem et al., 1985; van Kooten et al., 1992; Altankov et al., 1996).

En el presente trabajo medimos el ángulo de contacto de mezclas de quitosano-gelatina depositando gotas de agua mili-Q sobre cada una de las superficies. Los datos obtenidos (**Figura 21**) indican que aunque las diferencias entre los valores de ángulo de contacto de las distintas superficies no fue significativa, los valores más bajos se observaron para las mezclas con una relación en peso de quitosano/gelatina de **0.4** ($73.6^\circ \pm 2.2$) y **0.6** ($71.5^\circ \pm 8$), indicando que estas dos superficies son las más hidrofílicas y, por tanto, las más promotoras de la adhesión celular. Este comportamiento difiere del publicado previamente para superficies de quitosano al 1% (Cheng et al., 2003b), donde el aumento progresivo de gelatina induce una disminución paulatina de los ángulos de contacto, indicando que la superficie de los geles se iba haciendo más hidrofílica.

Figura 20: Ensayos de proliferación de células de línea PC12 sobre superficies de quitosano al 1 y 2%. El análisis se realizó estudiando la transformación de MTT sobre las dos superficies comparadas con un control de plástico + PLL, a los días 1 (barras blancas) y 4 (barras negras) de su cultivo (A). Hubo diferencias significativas a los dos tiempos entre los controles y las dos superficies de quitosano (asteriscos negros). Alternativamente, se realizó una comparación estadística entre los datos de las dos superficies de quitosano, donde se observaron diferencias significativas entre las dos superficies de quitosano siendo el óptimo al 2% (asterisco rojo). (Representación de la media \pm error estándar de 7 replicaciones). Abajo, imágenes representativas del crecimiento de las células PC12 sobre las superficies de plástico + PLL (P+PLL), quitosano 1% (Q1) y quitosano 2% (Q2) a los días 1 (-1) y 4 (-4) de su cultivo. Se puede observar como la densidad celular sobre las superficies control es mayor que sobre las superficies de quitosano, lo que explica las diferencias en la actividad metabólica vista con los ensayos de MTT. (Barras: 100 μ m).

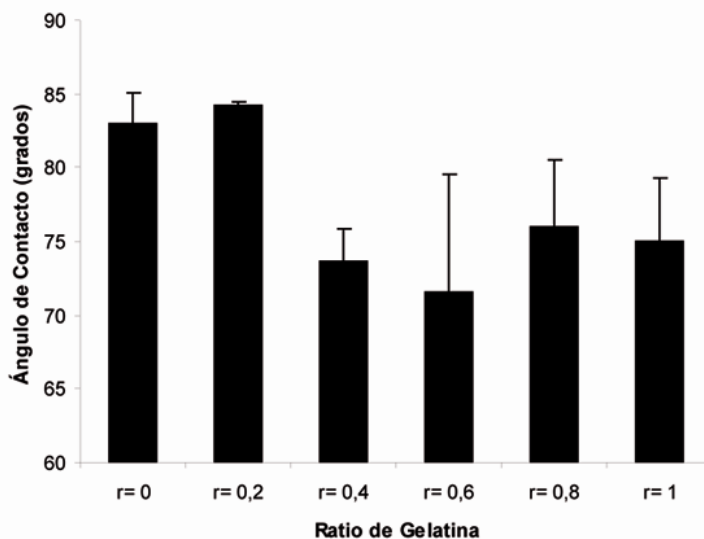


Figura 21: Medida del grado de humectación de las mezclas de quitosano + gelatina. Se midió el ángulo de contacto en las superficies de las mezclas de quitosano con gelatina a distintas proporciones en peso. Se observa una tendencia a que los ángulos de contacto inferiores (superficies más hidrofílicas) correspondieron a las superficies con una relación en peso de gelatina de 0.4 y 0.6. (Representación de la media \pm error estándar; n=3).

4.2.2. Estudios de diferenciación sobre superficies de *quitosano + gelatina*

En esta parte del trabajo hemos comprobado el efecto del aumento de la concentración de gelatina al mezclarla con quitosano en proporciones publicadas previamente para concentraciones de quitosano del 1% (Cheng et al., 2003b). Las relaciones en peso de gelatina fueron los mismos que los publicados: $r_g=0$ (quitosano), 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 (gelatina), utilizando como control positivo pocillos sin material añadido y pretratados con una solución de PLL. Cultivamos en estas superficies células de línea PC12 expuestas a la acción de la neurotrofina NGF, y evaluamos dos parámetros: porcentaje de células con neuritas y longitud neurítica relativa tras 1 y 6 días de cultivo.

El porcentaje de células con neuritas fue significativamente menor ($F(1,42)= 15.98$; $p<0.01$) tras 6 días de cultivo, indicando que el paso de los días inhibe tanto la emisión como la elongación neuríticas. Esta disminución, según el tipo de superficie, se registró en todos los sustratos excepto en la gelatina, donde aumentó. La disminución fue significativa ($p< 0.01$) en los pocillos con un 2% de quitosano y la mezcla con $r_g= 0.2$. En el resto de sustratos, la disminución no fue significativa, aunque fue sugestivo de una tendencia a la baja (Figura 22).

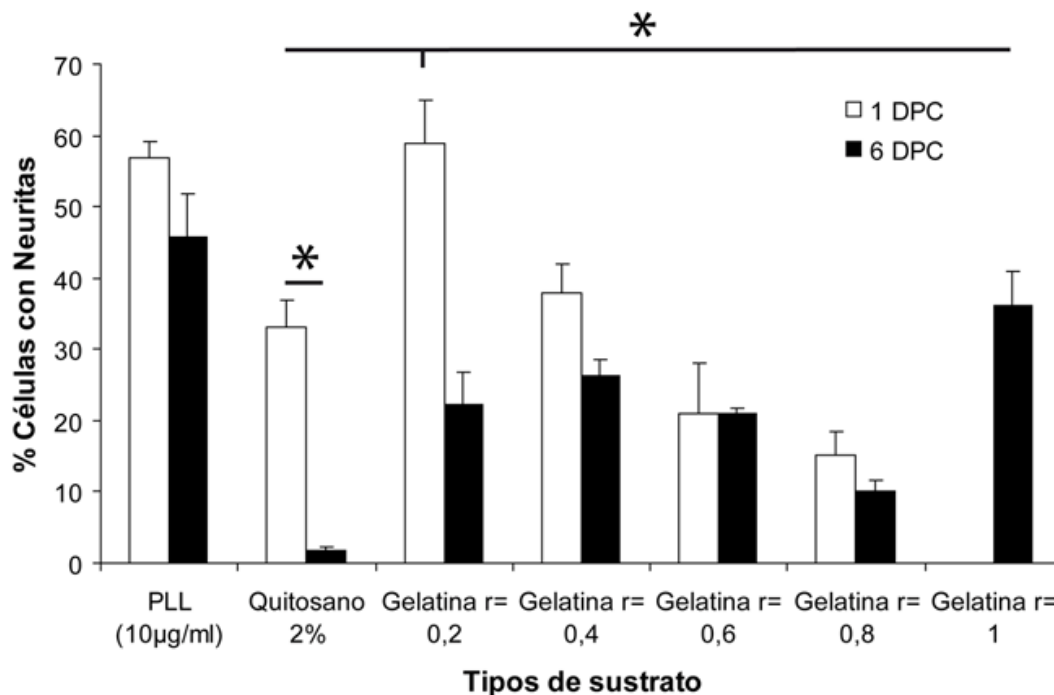


Figura 22: Diferenciación de células PC12 sobre las mezclas de quitosano + gelatina. Se midió el porcentaje de células PC12 que emitieron neuritas a 1 (barras blancas) y 6 (barras negras) días de su cultivo sobre las distintas superficies a las relaciones en peso de gelatina de: 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1, tomando como control a superficies de pocillos recubiertas con una solución de PLL a 10µg/ml. A 1 día del cultivo el porcentaje mayor de células con neuritas se encontró en los controles y en la $r_g=0,2$, que mostró diferencias significativas con todas las superficies excepto con los controles (asterisco). A los 6 días se mantuvo el porcentaje mayor en los controles, con valores similares a los de $r_g=1$, mientras que el resto de mezclas presentó valores similares. Los valores numéricos más altos se observaron en la mezcla con un $r_g=0,4$, indicando que esta fue la mezcla óptima para modificar el quitosano (Representación de la media \pm error estándar de 4 replicaciones).

Así, en el día 1 de cultivo el porcentaje mayor de células con neuritas se observó para la mezcla $r_g=0,2$, similar al control y con diferencias significativas con respecto al resto de sustratos. Sin embargo, a los 6 días el porcentaje de diferenciación en este sustrato cayó hasta situarse en valores cercanos a los del resto de sustratos, o incluso ligeramente inferiores. En las superficies de gelatina ($r_g=1$) no se detectaron células con neuritas 1 día después de su cultivo, aunque se pasó al 36% de células con neuritas a los 6 días, situándose en valores cercanos al control. Estos datos contrastan con los publicados previamente por Cheng M. (Cheng et al., 2003b), quién observó un porcentaje superior al 60% de células con neuritas mayores a 10µm a 1 día de su cultivo.

Tras 6 días de cultivo no se observaron diferencias significativas en los valores de diferenciación entre las distintas mezclas, indicando que todas ellas presentaron niveles similares de permisividad para la adhesión y emisión neurítica. Sin embargo, de entre

todas las mezclas de *quitosano* + *gelatina*, el porcentaje más alto de células con neuritas, con $26.2 \pm 2.4\%$, correspondió a la mezcla con un $r_g = 0.4$ ($r_g 0.2 = 22.2 \pm 4.7\%$; $r_g 0.6 = 21 \pm 0.7\%$; $r_g 0.8 = 10.2 \pm 1.5\%$), que se considerará como la óptima de entre todas ellas.

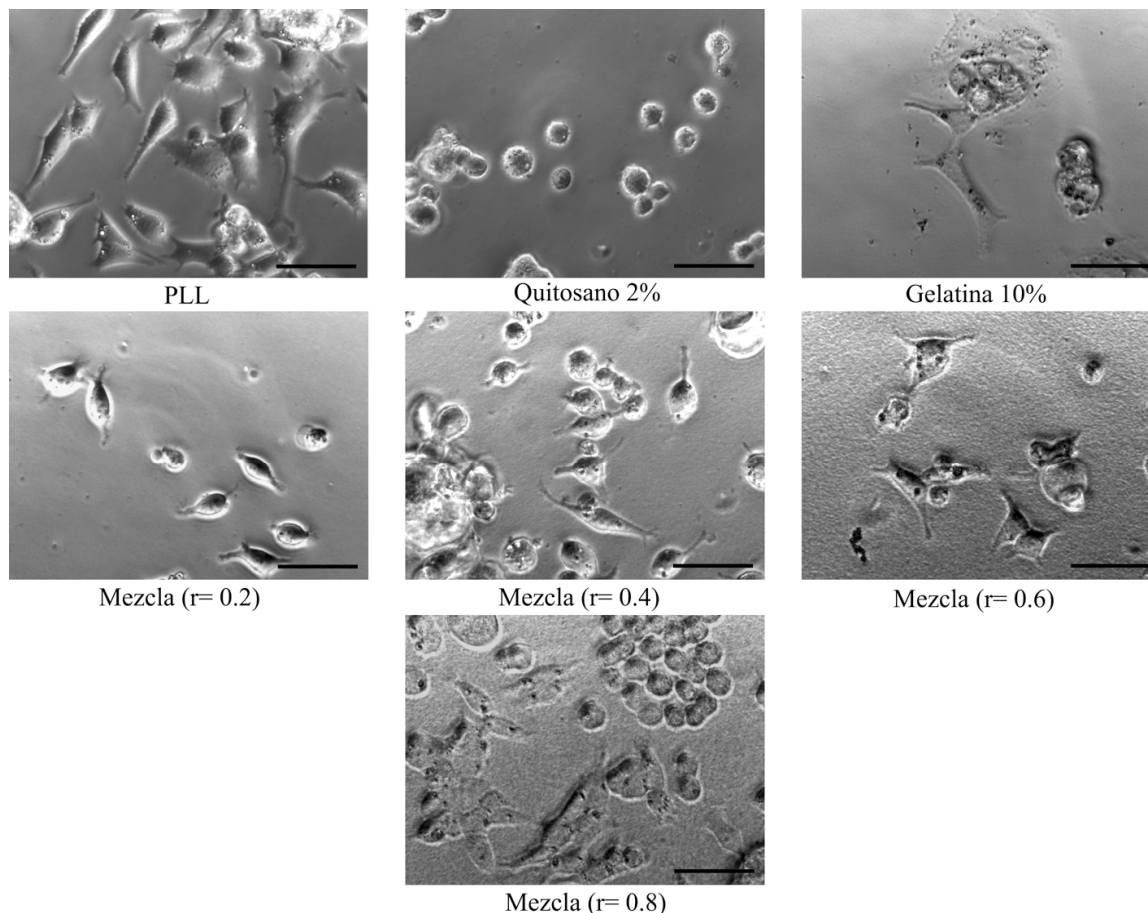


Figura 23: Células PC12 creciendo sobre superficies de *quitosano* + *gelatina*. Imágenes del aspecto de las células creciendo tras 6 días de su cultivo expuestas a NGF en cada mezcla. Se observa la ausencia de neuritas en las superficies de quitosano 2%, con células redondeadas y en flotación. En el resto de superficies, las células con neuritas y la longitud neurítica fue similar. (Barras: 50 μ m).

Además del porcentaje de células con neuritas, se estudió la longitud neurítica total desarrollada en cada sustrato. Este dato se calculó en función únicamente de las células que emitieron neuritas, ya que hubo una parte de las células que sin neuritas que fueron consideradas una subpoblación de células PC12 diferentes (**Figura 23**). El análisis de los datos muestra una ligera tendencia a que la longitud neurítica decaiga entre los días 1 y 6 de cultivo, aunque las diferencias no fueron significativas. Entre las distintas superficies, las diferencias más notables se encontraron entre los valores de las superficies control (plástico + PLL) y el resto de superficies a los dos tiempos, siendo

estas diferencias significativas ($p < 0.01$) con respecto a todos ellos. En el resto de superficies, las 4 mezclas de quitosano-gelatina presentaron un comportamiento similar (**Figura 24**), sin diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Los comportamientos observados en el quitosano 2%, donde la longitud de neuritas a los 6 días fue prácticamente indetectable, mostrando que es una superficie inhibitoria de la elongación neurítica, y en la gelatina, donde se pasó de una longitud de $0\mu\text{m}$ a una media de $51,2 \pm 15,5\mu\text{m}$, indicando que es una superficie promotora de la neuritogénesis, fueron excepcionales. Sin embargo, si se tienen en cuenta los datos numéricos, a 1 día de cultivo la mezcla con un $r_g = 0.2$ fue, nuevamente, la que mejor se comportó, con una longitud de $93.7 \pm 8.9\mu\text{m}$, mientras que a los 6 días la longitud neurítica mayor se correspondió con la mezcla con $r_g = 0.4$, con una longitud de $70.5 \pm 8\mu\text{m}$. Por tanto, consideramos que la mezcla con un $r_g = 0.4$ presentó un comportamiento óptimo.

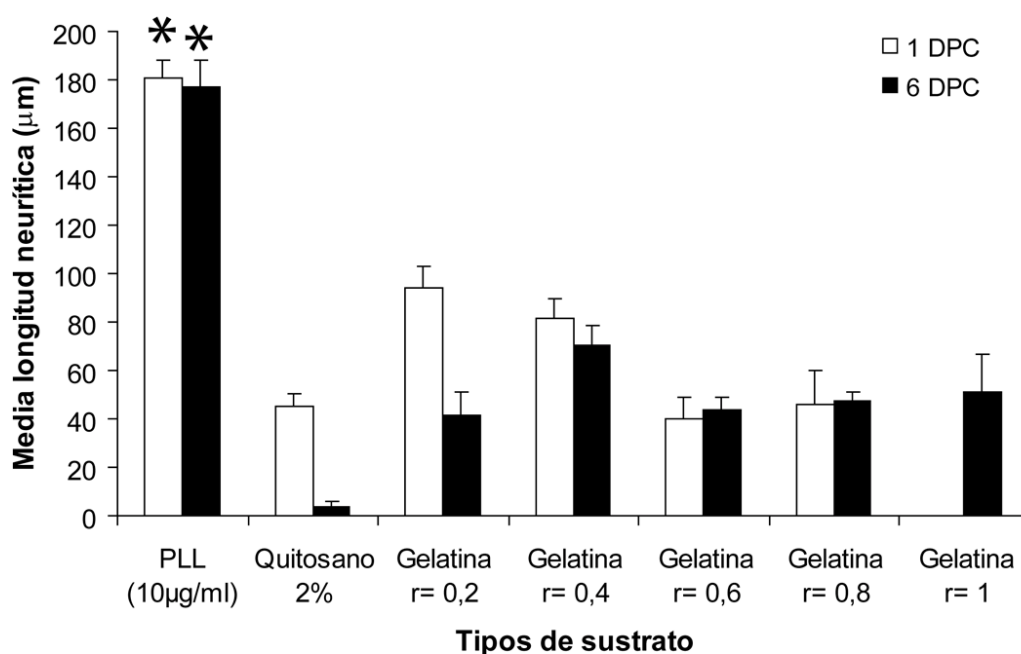


Figura 24: Longitud neurítica relativa de células PC12 sobre las superficies de quitosano + gelatina. Se tomaron como controles a pocillos recubiertos de PLL. Células creciendo a 1 (barras blancas) y 6 (barras negras) días de su cultivo. Los óptimos de crecimiento se observaron en los controles, con valores estadísticamente superiores a las demás superficies. El resto de superficies se mantuvo en rangos similares, aunque fue la mezcla con una relación de gelatina de 0.4 la que dio lugar a la longitud neurítica mayor. (Representación de la media \pm error estándar de 4 replicaciones).

Estos resultados reflejan que todas las mezclas de *quitosano + gelatina* son bioactivas, es decir, permiten la adhesión celular y la emisión y elongación de neuritas en las células

PC12 inducidas por NGF. En general, los cultivos mostraron que la emisión de neuritas cae drásticamente con el paso del tiempo en las superficies de quitosano 2% y en la mezcla $r_g = 0.2$, mientras que se mantiene en el resto de mezclas a medida que aumenta el porcentaje de gelatina. Sin embargo, los valores numéricos más altos, y, por tanto, los óptimos de todas las mezclas, se encontraron sobre las superficies con un $r_g = 0.4$, de modo que se consideró a esta mezcla como la idónea para ser utilizada en la modificación del quitosano con la gelatina. Estos datos contrastan con lo publicado previamente para soluciones de quitosano al 1%, donde el sustrato de crecimiento óptimo correspondió a la mezcla con un $r_g = 0.6$.

4.2.3. Estudios de adhesión a superficies de *quitosano + poli-L-lisina*

Como en el caso de la gelatina, iniciamos el trabajo replicando los experimentos publicados previamente (Mingyu et al., 2004) para estudiar la dependencia de la concentración de quitosano cuando éste se asocia a moléculas pro-adhesivas de PLL. Examinamos la adhesión de células PC12 expuestas a la neurotrofina NGF, a pocillos tratados con mezclas de *quitosano + PLL*, incubadas en medio con y sin suero durante 4 horas.

El porcentaje superior de células adheridas se obtuvo en medio de cultivo con suero sobre superficies con quitosano al 2% y en mezclas con una relación en peso de PLL (r_{PLL}) de 0.01, 0.02 y 0.03, sin diferencias significativas entre ellos (**Figura 25**). Cuando se compararon los datos con sus réplicas en medio sin suero, el número de células adheridas experimentó una disminución no significativa en todos los sustratos. El análisis conjunto de los datos, donde se comparan las diferencias de adhesión entre el medio con suero y sin él, independientemente de la superficie, sin embargo, sí mostró una disminución significativa ($F(1,24) = 16.2$; $p < 0.01$), indicando que el suero promueve adhesión celular. Sin embargo, los valores de adhesión registrados fueron mayores a los observados para soluciones de quitosano al 1%, superando en todos los casos 6×10^4 células/cm² en el medio sin suero y 10×10^4 células/cm² en el medio con suero, mientras que si la concentración de solución inicial de quitosano fue del 1%, los valores oscilaron desde menos de 1×10^4 células/cm² para el quitosano en medio sin suero y más de 7×10^4 células/cm² en la mezcla PL-3 en el medio con suero (Mingyu et al., 2004).

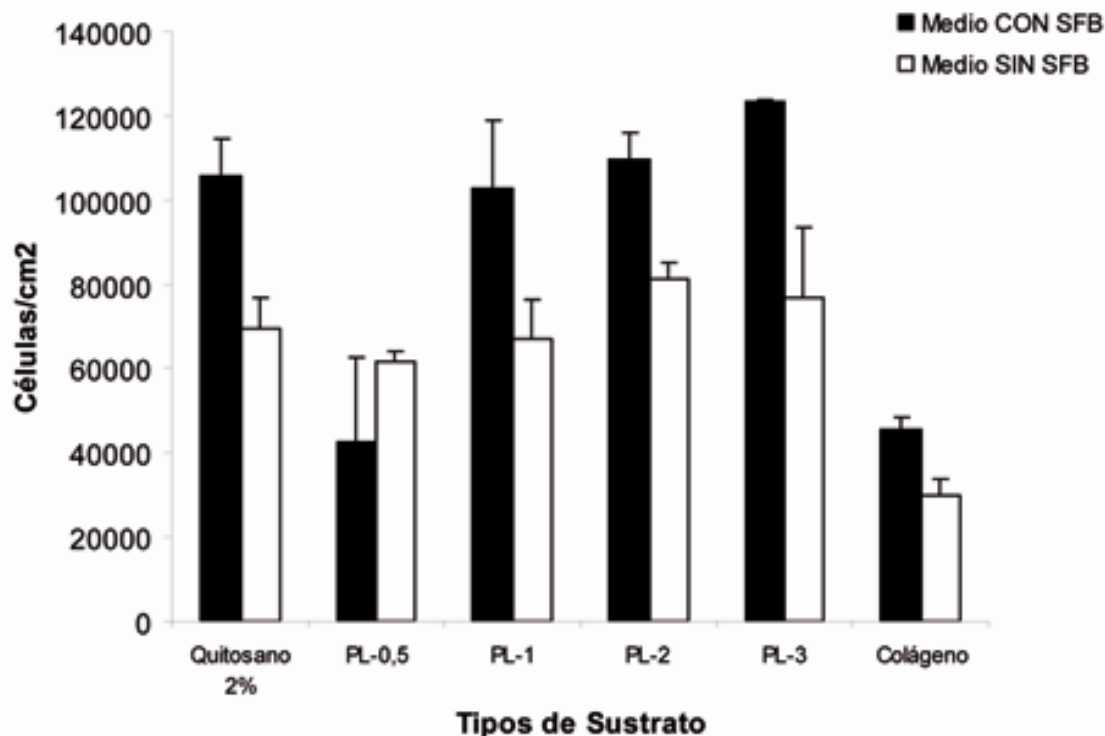


Figura 25: Adhesión de células PC12 sobre las mezclas del quitosano + PLL. Las mezclas se compararon con superficies de colágeno como control positivo. Se representa el número de células adheridas tras 4 horas del cultivo celular en medio con suero (barras negras) o sin suero (barras blancas). No se observaron diferencias significativas entre ellos, aunque se observó que la adición de suero al medio mejoró la adhesión. (Representación de la media \pm error estándar, con $n=4$ para quitosano 2% y colágeno; $n=3$ para PL-0.5, PL-1, PL-2 y PL-3).

Estos datos sugieren que las mezclas de *quitosano + PLL* presentan propiedades similares de adhesión celular cuando la solución de quitosano de partida es al 2% de concentración y que, además el aumento progresivo de la cantidad de PLL a la mezcla no mejoró las propiedades adhesivas de los sustratos, al contrario de lo que se había descrito para soluciones de quitosano al 1% (Mignyu et al., 2004).

4.2.4. Estudios de diferenciación en superficies de *quitosano + poli-L-lisina*

Los estudios de diferenciación se llevaron a cabo de manera similar a lo publicado previamente (Mingyu et al., 2004) y siguiendo el mismo procedimiento que el aplicado a los estudios sobre las superficies de *quitosano + gelatina*. Estos experimentos complementan los de adhesión, buscando las mezclas de quitosano 2% con PLL para promover adhesión y neuritogénesis con cultivos celulares de PC12.

Los datos de diferenciación (% de células con neuritas) fueron muy irregulares entre los distintos sustratos y tiempos (**Figura 26**). El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre las distintas superficies ($F(5,42)= 17.527$; $p<0.01$), con valores de diferenciación más altos en las mezclas correspondientes a PL-0.5 y PL-1, similares a los observados en el control de colágeno, apuntando a estas dos mezclas como las óptimas. En todos los sustratos, excepto en el control, el porcentaje más alto de diferenciación se observó en el primer día de cultivo. A partir de ahí la proporción de células diferenciadas cayó hasta el tercer día de cultivo, recuperándose en quitosano 2%, PL-1 y PL-3, indicando que únicamente estas dos mezclas promovieron la neuritogénesis a más largo plazo, aunque con valores inferiores, en todo caso, a los observados en PL-0.5.

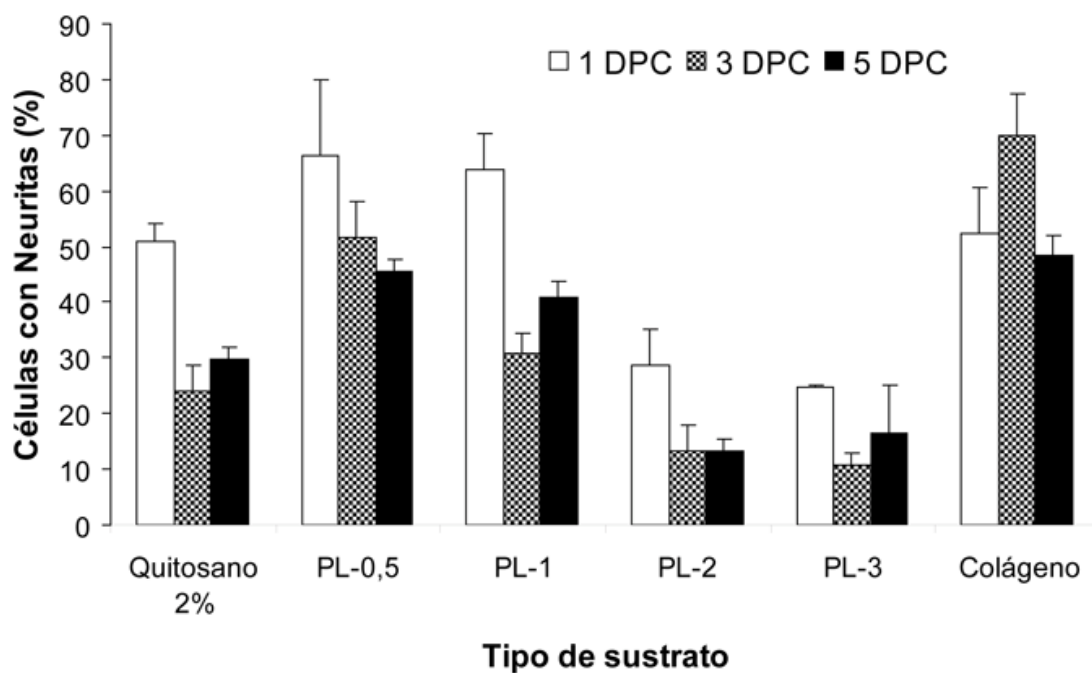


Figura 26: Diferenciación de células PC12 sobre superficies de quitosano + PLL. Se compararon las distintas mezclas con superficies de colágeno como control positivo. Representación del porcentaje a los días 1 (barras blancas), 3 (barras con cuadrados) y 5 (barras negras) de su cultivo. Se observó disminución en la diferenciación a los 3 días en todos los sustratos exceptuando el control. Tras 5 días, se produjo una ligera recuperación del porcentaje en el quitosano 2%, en PL-1 ($r_{p11}= 0.01$) y PL-3 ($r_{p11}= 0.03$), siendo estas mezclas las únicas que inducen la emisión de neuritas a largo plazo. De las dos, los valores numéricos mayores corresponden a PL-1, que resultó ser la óptima con un porcentaje del $40.8\pm 3\%$. (Representación de la media \pm error estándar, con $n= 4$ para quitosano 2%, PL-0.5, PL-1 y colágeno; $n=3$ para PL-2 y PL-3)

Por tanto, de entre las 4 mezclas ensayadas de *quitosano + PLL*, aquellas con menor proporción de PLL (PL-0.5 y PL-1) fueron las más promotoras de la neuritogénesis. En

ambos casos el porcentaje de diferenciación cayó entre el día 1 y el 3, pasando de $66.2 \pm 13.5\%$ a $51.5 \pm 6.7\%$ para PL-0.5 y de $63.8 \pm 6.3\%$ a $30.9 \pm 3.5\%$ para PL-1. Sin embargo, únicamente PL-1 recuperó los valores a largo plazo, pasando a $40.8 \pm 3\%$ a los 5 días, mientras que PL-0.5 continuó cayendo desde ese porcentaje ($45.6 \pm 2\%$). Aunque no hubo diferencias significativas entre los valores a los 5 días, ni entre ellos ni con el control, la tendencia a mejorar con el tiempo observada en PL-1, hace de ésta mezcla la más adecuada entre todas las ensayadas.

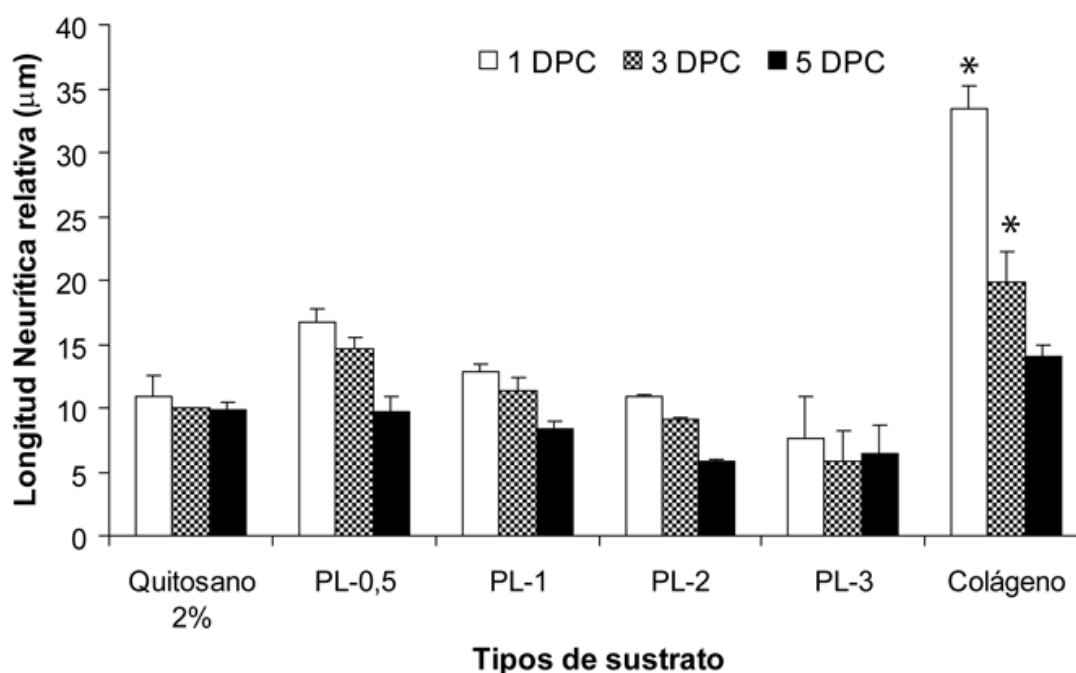


Figura 27: Longitud neurítica relativa de las células PC12 sobre superficies de quitosano + PLL. Se compararon con superficies de colágeno como control positivo, a los días 1, 3 y 5 de su cultivo. Se observó la elongación neurítica más alta en el colágeno, siendo significativamente distinta al resto de sustratos a los días 1 y 3. En el resto de superficies la longitud neurítica fue similar entre los 3 tiempos, con valores que no superaron las $20\mu\text{m}$ en ninguno de ellos. (Representación de la media \pm error estándar, con $n=4$ para quitosano 2%, PL-0.5, PL-1 y colágeno; $n=3$ para PL-2 y PL-3).

Las diferencias de longitud relativa de las neuritas (**Figura 27**), muestra que la asociación de quitosano + PLL conduce a una variabilidad de los valores mucho menor, sugiriendo que todas las mezclas promueven de forma similar la elongación neurítica. Como era de esperar, el sustrato control (colágeno) presentó los valores más altos a todos los tiempos, con valores significativamente ($p < 0.01$) mayores a los del resto de

superficies en los días 1 y 3, independientemente de que el porcentaje de células con neuritas fuese muy diferente al del resto de sustratos. En todos los casos se observó una ligera caída de la longitud según transcurría el tiempo de cultivo situándose, tras 5 días, en valores similares en todas las superficies, con longitudes que variaron entre los 6.4 ± 2.2 y las $9.8 \pm 0.6 \mu\text{m}$. A diferencia de lo publicado previamente con soluciones de quitosano al 1% (Mingyu et al., 2004), en nuestro caso el aumento en la proporción de PLL en la mezcla no causó un aumento progresivo en la longitud de las neuritas, ni promovió elongaciones como las descritas previamente, donde tras 5 días se superaban siempre las $30 \mu\text{m}$, llegando incluso a las $70 \mu\text{m}$ en la mezcla PL-3. Estos datos indican que el aumento en la concentración de quitosano bloquea considerablemente la emisión y extensión neurítica de células de línea PC12 tratadas con NGF. Una imagen representativa del estado de las células tras 5 días de su cultivo (**Figura 28**), muestra claramente que la longitud de neuritas es mayor en el control de colágeno, mientras que en el resto de superficies es estadísticamente similar.

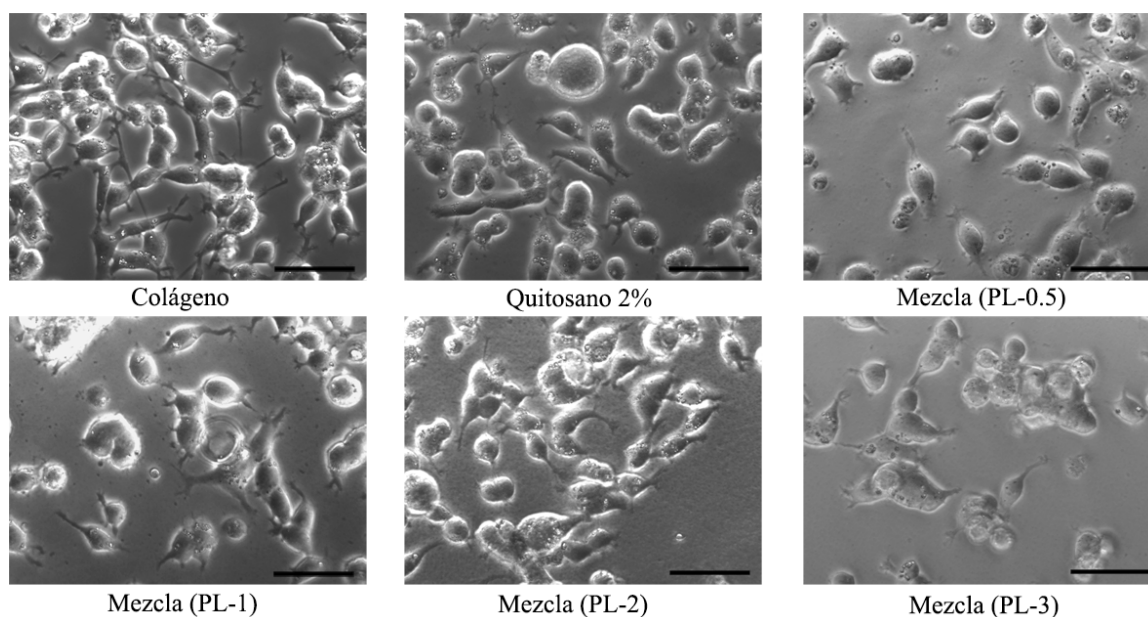


Figura 28: Cultivo de células PC12 en las superficies de quitosano + PLL tras 5 días. El cultivo se realizó sobre las distintas mezclas comparando con superficies de colágeno como control. La mayor longitud neurítica se observó en el colágeno, mientras que en el resto de superficies el estado de las células fue similar. (Barras: $50 \mu\text{m}$).

Teniendo en cuenta que la longitud de las neuritas fue similar en todas las superficies, pero que el porcentaje de diferenciación más alto a largo plazo se dio en PL-1, que fue el único sustrato que indujo aumento de este porcentaje tras la caída

registrada al 3^{er} día de cultivo, se eligió la relación en peso de quitosano/PLL de **0.01** como la óptima para modificar los geles de quitosano preparados a partir de una solución al 2%.

4.2.5. Relaciones en peso de gelatina y poli-L-lisina óptimas para modificar el quitosano al 2%

Con respecto a publicaciones previas, nuestros datos indicaron que a medida que varía la concentración inicial de quitosano, y, por tanto, la consistencia de los materiales, se produce una variación en el comportamiento de las células cultivadas sobre su superficie, indicando la necesidad de realizar estudios *in vitro* previos para evaluar geles en los cuales la concentración de los compuestos de partida hayan variado. En este estudio, una vez realizadas estas comprobaciones, determinamos que los sustratos de elección para su uso en reparación nerviosa son mezclas de *quitosano + gelatina* con un $r_g = 0.4$ y *quitosano + PLL* con un $r_{pll} = 0.01$. En ambos casos, los datos correspondientes al comportamiento de las células PC12, diferenciadas a fenotipo neuronal con NGF, fueron peores a los obtenidos con las mezclas con una solución de quitosano inicial del 1%. Sin embargo, estos resultados más desfavorables se asumieron con la finalidad de obtener un sustrato más consistente y moldeable para su uso como puente en la reparación de lesiones de médula espinal.

4.3. MODIFICACIONES DEL QUITOSANO AL 2% MEDIANTE SU MEZCLA CON GELATINA ($r_g = 0.4$) Y POLI-L-LISINA ($r_{pll} = 0.01$)

4.3.1. Estudio de la morfología por microscopía electrónica de barrido ambiental

La superficie de *quitosano al 2%* y sus asociaciones con gelatina y PLL fue estudiada por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM). El *quitosano al 2%* y cada una de sus asociaciones con gelatina y PLL mostraron morfologías similares (**Figura 29**), consistentes en unas estructuras porosas dispuestas radialmente, con distinto grado de compactación. En el *quitosano 2%* se encontraron poros de diámetro interior medio de $87,2 \pm 5,2 \mu m$, formando paredes longitudinales paralelas en cuyo interior se observaron unos pliegues que cortan a cada superficie con una disposición más o menos transversal,

y que, probablemente, aportan dureza al material. Entre las paredes principales de los poros se observaron depósitos fibrosos pequeños, formando mallas musgosas que, probablemente, se corresponden con distintos componentes del quitosano, como trazas de quitina. La mezcla de *quitosano* + *gelatina* formó una estructura mucho más compacta, en la que el diámetro interno medio de los poros, de $18,3 \pm 1,3 \mu\text{m}$, es significativamente menor ($p < 0.01$) que el encontrado en el quitosano solo, o sea se redujo en prácticamente 5 veces. La disposición de los poros conservó la estructura radial observada para el quitosano, aunque se observó la existencia de una malla fibrosa entre las paredes de los poros que mantiene a éstos fuertemente unidos, confiriendo consistencia extra al material y hace disminuir el tamaño del poro. Estas fibras se corresponden, probablemente, con la gelatina que aparece fuertemente adherida a las paredes del quitosano, dando mayor rigidez a la estructura. La mezcla de *quitosano* + *PLL* presentó una morfología muy similar a la del *quitosano* 2%, de modo que sus poros, con un diámetro interno de $76,2 \pm 6,6 \mu\text{m}$, no fueron significativamente distintos a los observados en el *quitosano* 2%. En este caso se observaron de nuevo acúmulos de fibras musgosas sobre las paredes del quitosano, indicando que, o bien son trazas de otros componentes del quitosano, o bien se corresponden con la PLL asociada al quitosano. En este caso se observaron trabéculas uniendo las paredes de los poros de lado a lado y formando una estructura continua con las acumulaciones fibrosas, lo que sugiere que la PLL da lugar a estas estructuras. Por último, la mezcla de los tres componentes utilizados, de *quitosano* + *gelatina* + *PLL*, mostró una estructura mucho más homogénea en la cual las paredes del material formaron unos poros con morfología poligonal, sobre las cuales no apareció ningún tipo de fibra ni depósito de otros componentes. Esta homogeneidad hace pensar que la mezcla de los tres materiales indujo interacciones químicas entre los tres compuestos dando lugar a una entidad con estructura propia. Cabe resaltar que en este caso el diámetro interno medio de los poros aumentó considerablemente hasta las $121,6 \pm 8,4 \mu\text{m}$, lo que hace de esta mezcla el material más poroso aunque con una estructura interna rígida, mostrada por la regularidad en las paredes de sus poros.

La muestra de *gelatina* 1.3% no se pudo estudiar mediante ESEM al perder la morfología en el procesado de la muestra.

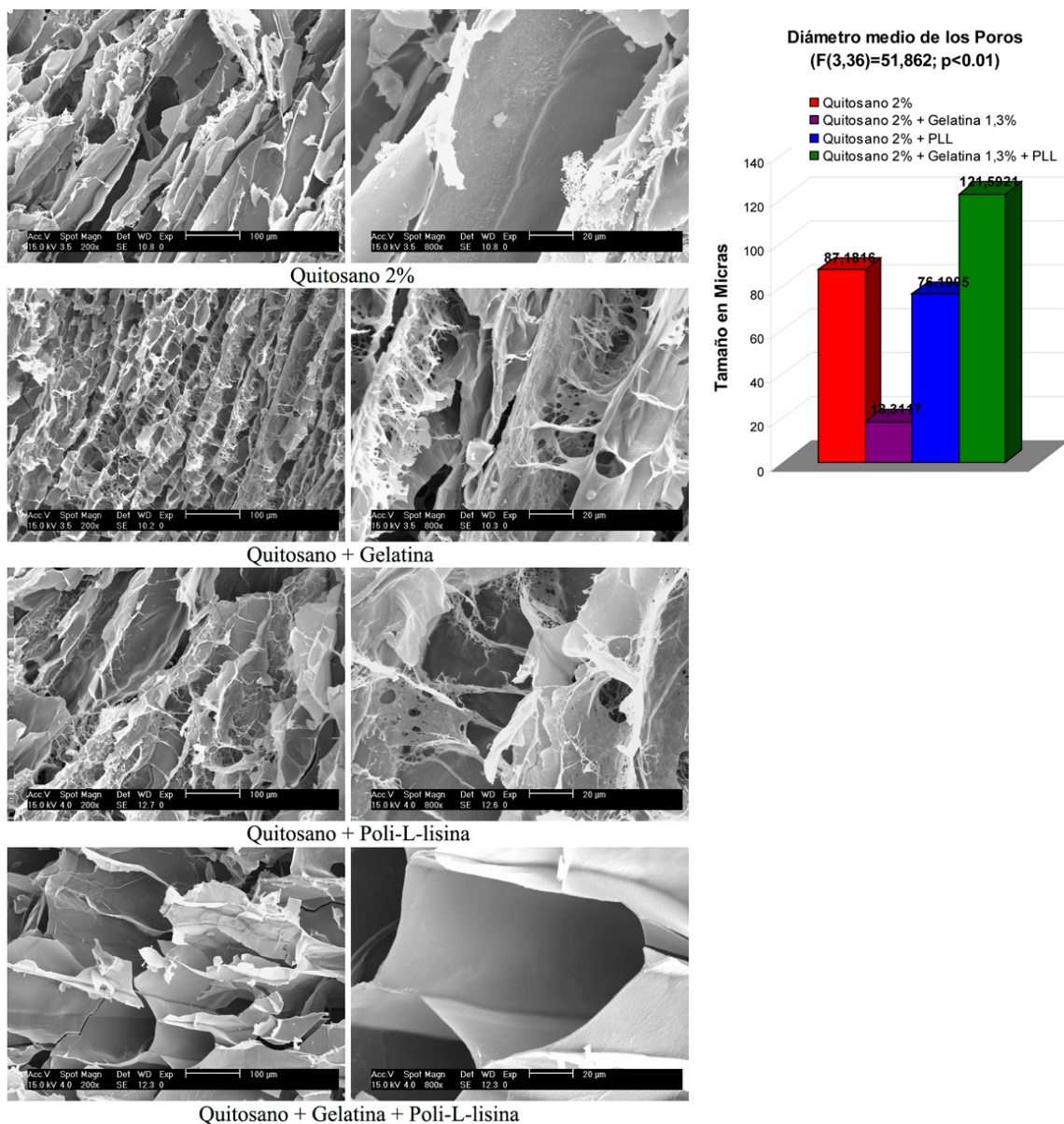


Figura 29: Quitosano y sus mezclas con gelatina y poli-L-lisina al microscopio electrónico de barrido ambiental. Las imágenes muestran cortes transversales de bloques de los geles liofilizados a 200X (izquierda) o a 800X (derecha). La morfología fue similar aunque difirió el grado de compactación. En el *quitosano 2%* se apreciaron depósitos de otros materiales sobre las paredes principales de los poros; en la mezcla *quitosano + gelatina* aparecieron depósitos a modo de mallas musgosas, presentando la estructura más compacta; el *quitosano + PLL* presentó un aspecto similar al *quitosano 2%*, mientras que la mezcla de los tres componentes dio lugar a una estructura mucho más regular y sin depósitos en sus paredes. En el gráfico se representa una estimación del diámetro de los poros, medido con ayuda del software ImageJ v1.39q. En él se observa que la mezcla de *quitosano + gelatina* tuvo el menor tamaño de poro, mientras que la mezcla de los 3 compuestos dio lugar a los poros de mayor tamaño. (Barras: 100µm en las imágenes de la izquierda; 20µm a la derecha. En el gráfico, n= 10).

4.3.2. Caracterización físico-química de los materiales

4.3.2.1. Medidas del grado de humectación de las distintas superficies

Comentamos anteriormente que el ángulo de contacto define el grado de tensión superficial que presenta un material, lo que está relacionado con el grado de hidrofobicidad o hidrofiliidad. También comentamos que las superficies más hidrofílicas, con ángulos de contacto inferiores a 65° , favorecen la adhesión celular. En este caso, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medidas de ángulo de contacto entre las distintas superficies (**Figura 30**), mostrando todas ellas ángulos similares. La superficie con mayor ángulo de contacto, y, por lo tanto, la más hidrofóbica, fue la de *quitosano* 2% ($83 \pm 2^\circ$) lo que indica que es la que peor adhesividad presentará. Del resto de superficies, tanto la *gelatina* 1.3% como las mezclas del quitosano con gelatina, PLL o ambas a la vez, mostraron ángulos de contacto muy similares, en torno a los 75° , indicando que todas ellas presentarán una hidrofiliidad similar. Sin embargo, y puesto que los ángulos de contacto más bajos son más adhesivos, la tendencia es a que la mezcla de *quitosano* + *gelatina*, con un ángulo de contacto de $73,65 \pm 2,2^\circ$, sea la que mejor adhesividad presente. Estos resultados se corresponderán con lo visto a continuación sobre cultivos celulares, donde esta mezcla resultó ser la más adhesiva.

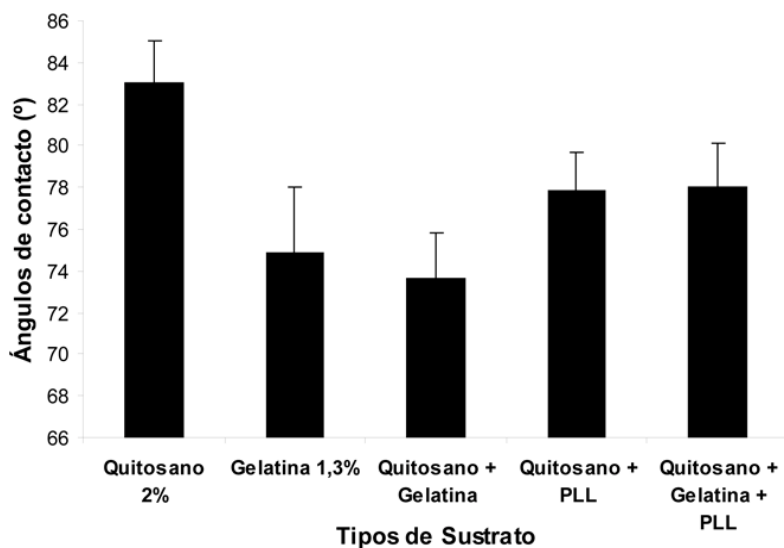


Figura 30: Grado de humectación de las mezclas de quitosano con gelatina y PLL. No se registraron diferencias significativas entre las superficies, aunque los valores de ángulo menores (superficies más hidrofílicas) fueron para la mezcla de *quitosano* + *gelatina*, con un ángulo de $73,65 \pm 2,2^\circ$. (N= 3).

Cabe destacar nuevamente las diferencias observadas con respecto publicaciones previas para las mezclas realizadas a partir de una solución de quitosano al 1%, donde los ángulos de contacto fueron menores (Cheng et al., 2003b; Mingyu et al., 2004). Esto nos indica que el aumento en la concentración de quitosano al 2% aumentó la hidrofobicidad de las superficies construidas con ella.

4.3.2.2. Espectrofotometría infrarroja de transformada de Fourier

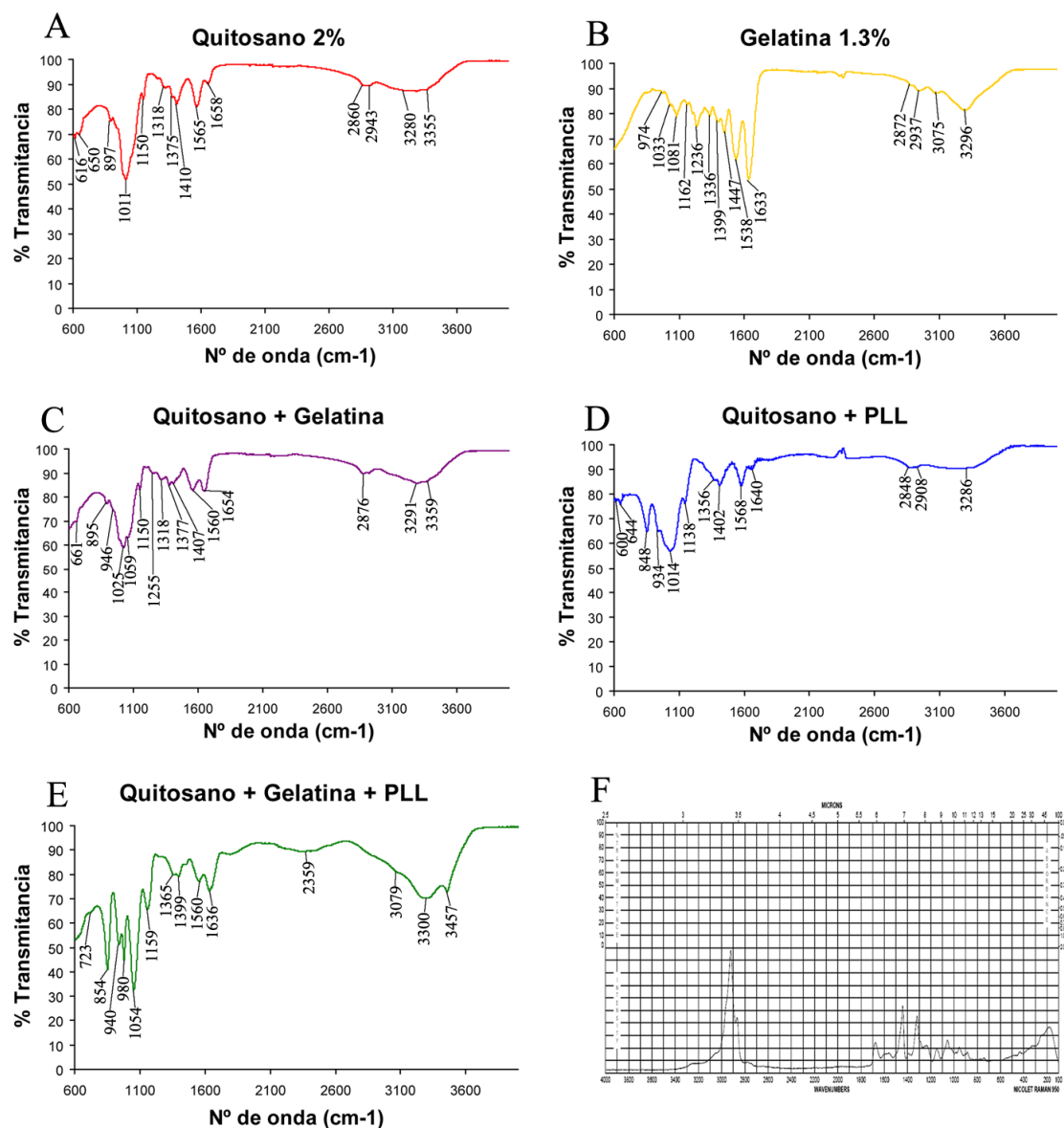


Figura 31: Interferogramas de absorción en el infrarrojo (FTIR) de las mezclas de quitosano con gelatina y PLL. Existen dos regiones características: i) vibración entre $800\text{-}1200\text{cm}^{-1}$, típica de los enlaces de la estructura en anillo del azúcar; ii) vibración por encima de 3000cm^{-1} , característica de los enlaces -OH y -NH. En F se representa el interferograma de la PLL, obtenido de la página web de Sigma-Aldrich.

Esta técnica se utilizó para identificar los grupos funcionales (tipos de enlaces químicos) característicos de cada molécula. Cuando los átomos que constituyen una molécula se irradian con un haz de luz infrarroja, se perturban las vibraciones moleculares, al absorber las moléculas la energía infrarroja a longitudes de onda características de cada tipo de enlace químico. Hay dos tipos de vibraciones moleculares: de **tensión o alargamiento** y de **deformación o flexión**. Cada enlace químico absorbe energía en regiones del espectro infrarrojo correspondientes a los dos tipos de vibraciones que puede experimentar ese enlace, lo que permite construir tablas que relacionan los picos de absorción en las distintas frecuencias del infrarrojo, en cm^{-1} , con cada tipo concreto de enlace químico (**Figura 11**).

En este trabajo realizamos un estudio por espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) del *quitosano 2%*, *gelatina 1.3%*, *quitosano + gelatina*, *quitosano + PLL* y *quitosano + gelatina + PLL*, en su forma liofilizada. A partir del material molturado, obtuvimos los interferogramas de absorción en el infrarrojo, representados como el inverso de la absorbancia o porcentaje de transmitancia de luz (**Figura 31**). Los picos de absorción de cada muestra se corresponden con unos enlaces químicos de estructura determinada (**Figura 32**) que pueden variar si se ha producido interacción química entre los grupos funcionales de las moléculas mezcladas.

En el *quitosano 2%* (**Figuras 31A y 32**) se pueden observar bandas residuales a $3280\text{-}3355\text{cm}^{-1}$ que se corresponden con la vibración por tensión de los grupos hidroxilo (-OH) y amino (-NH) libres de las moléculas de quitosano (Prashanth KV et al., 2002; bdel-Fattah et al., 2007). A continuación se ven dos picos correspondientes a la vibración por alargamiento de los enlaces -CH en $2860\text{-}2943\text{cm}^{-1}$ que no se corresponden exactamente con las descritas para quitosanos de otros orígenes. Por ejemplo, los enlaces -CH del quitosano procedente de la desacetilación de quitina de la concha de los camarones o de los huesos de jibia bandean en $2878\text{-}2968\text{cm}^{-1}$ (Van de Velde and Kiekens, 2004), mientras que los procedentes de la concha de moluscos completamente desacetilados bandean a 2892cm^{-1} (Kim et al., 2006). El resto de enlaces que estudiamos en las muestras también sufrió variaciones con respecto a lo descrito en la literatura. Así, el pico que define los grupos amido I ($\text{RC}=\text{O-NH}_2$) apareció en 1685cm^{-1} , mientras que en otros trabajos se ha descrito en 1642cm^{-1} (Kim et al., 2006), 1651cm^{-1} (Cheng et al., 2003b), 1660cm^{-1} (Focher et al., 1992) o 1665cm^{-1} (Prashanth et al., 2002; bdel-Fattah et al., 2007).

Lo mismo ocurrió para el grupo amido II ($\text{RC}=\text{O}-\text{NHR}$) que apareció en 1565cm^{-1} y está descrito en 1550cm^{-1} (Prashanth et al., 2002) o 1553cm^{-1} (Focher et al., 1992). Estas pequeñas diferencias probablemente sean consecuencia de las distintas interacciones atómicas que ocurren entre los grupos en el interior de las cadenas de quitosano como consecuencia de las distintas procedencias de los quitosanos utilizados en cada trabajo o de las distintas metodologías empleadas para su estudio por FTIR, pero asociado siempre a pequeños cambios de tipo electrolítico, nunca a interacciones covalentes. El siguiente grupo relevante fue la banda a 1410cm^{-1} del $-\text{CH}_2$ asociado a polisacáridos (Cael et al., 1974). Los picos de $1318-1375\text{cm}^{-1}$ corresponden a deformaciones en los enlaces $-\text{NH}$ y $\text{C}-\text{CH}_3$ (Focher et al., 1992) y por último las bandas entre $600-1100\text{cm}^{-1}$ que se corresponden con los anillos de la estructura sacarídica del quitosano, relacionándose la banda a 897 y 1011cm^{-1} con el anillo de glucopiranososa de la estructura del azúcar y la banda de 1050cm^{-1} como característica de la estructura en anillo (Cael et al., 1974).

TIPO DE MEZCLA	ENLACE	INTERVALO DE FRECUENCIAS (v cm^{-1})	TIPO DE MEZCLA	ENLACE	INTERVALO DE FRECUENCIAS (v cm^{-1})
Quitosano	Grupos $-\text{OH}$ (Hidroxilo) y $-\text{NH}$ (Amino)	3280-3335	Quitosano + Gelatina + PLL	Grupos $-\text{OH}$ y $-\text{NH}$	3300-3457
	Enlaces $-\text{CH}$ (alargamiento)	2860-2943		$-\text{NH}$ (Amino)	3079
	$\text{RC}=\text{O}-\text{NH}_2$ (amido I)	1685		$\text{C}\equiv\text{C}$, $\text{C}\equiv\text{N}$	2359
	Enlaces CH_2 y $\text{RC}=\text{O}-\text{NHR}$ (amido II)	1410-1565		$\text{RC}=\text{O}-\text{NH}_2$ (amido I)	1636
	Deformación del $\text{N}-\text{H}$ y de $\text{C}-\text{CH}_3$	1318-1375		$\text{RC}=\text{O}-\text{NHR}$ (amido II)	1560
	$\text{C}-\text{O}$ del anillo sacarídico	1150		Deformación del $\text{N}-\text{H}$ y de $\text{C}-\text{CH}_3$	1365-1399
Gelatina	Anillo glucopiranososa	1011	Quitosano + Gelatina + PLL	$\text{C}-\text{O}$ del anillo sacarídico	1159
	Grupos amida V y aromáticos	897		Anillo glucopiranososa	1054
	Grupos $-\text{OH}$ y $-\text{NH}$	3296		Grupos amida V y aromáticos	854-940-980
	$-\text{NH}$ (Amino)	3075			
	Enlaces $-\text{CH}$ (alargamiento)	2872-2937			
	$\text{RC}=\text{O}-\text{NH}_2$ (amido I)	1633			
Quitosano + Gelatina	$\text{RC}=\text{O}-\text{NHR}$ (amido II)	1538	Quitosano + Gelatina + PLL		
	Deformación del $\text{N}-\text{H}$ y de $\text{C}-\text{CH}_3$	1336-1399-1447			
	Enlaces $\text{C}-\text{O}$	1081-1162-1236			
	Amida V	974			
	Grupos $-\text{OH}$ y $-\text{NH}$	3291-3359			
	Enlaces $-\text{CH}$ (alargamiento)	2876			
Quitosano + Gelatina + PLL	$\text{RC}=\text{O}-\text{NH}_2$ (amido I)	1654	Quitosano + Gelatina + PLL		
	Enlaces CH_2 y $\text{RC}=\text{O}-\text{NHR}$ (amido II)	1407-1560			
	Deformación del $\text{N}-\text{H}$ y de $\text{C}-\text{CH}_3$	1318-1377			
	Enlaces $\text{C}-\text{O}$ gelatina	1255			
	$\text{C}-\text{O}$ del anillo sacarídico	1150			
	Anillo glucopiranososa	1025-1059			
Quitosano + PLL	Grupos amida V y aromáticos	895-946	Quitosano + Gelatina + PLL		
	Grupos $-\text{OH}$ y $-\text{NH}$	3286			
	Enlaces $-\text{CH}$ (alargamiento)	2848-2908			
	$\text{RC}=\text{O}-\text{NH}_2$ (amido I)	1640			
	Enlaces CH_2 y $\text{RC}=\text{O}-\text{NHR}$ (amido II)	1402-1568			
	Deformación del $\text{N}-\text{H}$ y de $\text{C}-\text{CH}_3$	1356			
Quitosano + PLL	$\text{C}-\text{O}$ del anillo sacarídico	1138	Quitosano + Gelatina + PLL		
	Anillo glucopiranososa	1014			
	Grupos amida V y aromáticos	848-934			

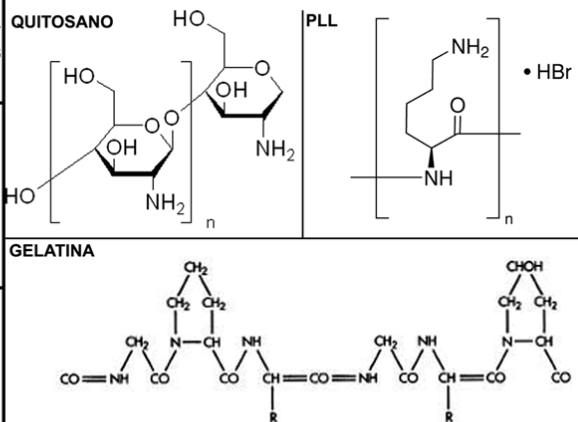


Figura 32: FTIR y enlaces químicos. Absorción en el infrarrojo más representativa de cada polímero y las mezclas con el enlace al que se corresponden. Abajo a la derecha, esquema de la estructura química del quitosano, gelatina y PLL.

En el interferograma de la *gelatina 1.3%* (**Figuras 31B y 32**) los picos más representativos se corresponden con grupos funcionales típicos de la estructura proteínica de la gelatina. Al igual que con el quitosano, aparecen bandas de grupos -OH y -NH libres en $3075\text{-}3296\text{cm}^{-1}$ de los aminoácidos terminales de la cadena proteica. Para el caso de la gelatina también observamos variaciones en los picos de absorción de energía con respecto a lo descrito por otros autores. De este modo, hemos detectado los picos para los grupos amido (I y II) en 1633cm^{-1} y 1538cm^{-1} y para los carboxilos de los aminoácidos en 1336cm^{-1} , 1399cm^{-1} y 1447cm^{-1} . Sin embargo, otros autores han registrado estos picos en torno a 1240cm^{-1} , 1540cm^{-1} y 1650cm^{-1} para los amido (I y II) y 1300cm^{-1} y 1450cm^{-1} para los carboxilo, cuando el quitosano se entrecruza químicamente con la gelatina (Kim et al., 2005a), mientras que otros autores han detectado estos picos en 1537cm^{-1} y 1655cm^{-1} cuando el quitosano se mezcla con la gelatina (Yin et al., 1999; Cheng et al., 2003b). Esto indica nuevamente que los desplazamientos de las energías de absorción molecular en FTIR se ven modificados según el tipo de interacciones químicas que ocurran entre las moléculas, del tipo de compuestos utilizados o del tipo de metodología empleada.

La mezcla de *quitosano + gelatina* (**Figuras 31C y 32**) mostró bandas a $3291\text{-}3359\text{cm}^{-1}$ correspondientes a los grupos -OH y -NH libres, similares a las observadas en el quitosano y la gelatina, indicando que la interacción entre estos grupos funcionales, o entre éstos y otros grupos de las moléculas, fueron débiles. La banda a 2876cm^{-1} de los grupos -CH observados en el quitosano y en la gelatina, y la banda a 1654cm^{-1} que según lo descrito se corresponde con el grupo carbonilo de los aminoácidos de la gelatina en mezclas con quitosano al 1% (Yin et al., 1999; Cheng et al., 2003b) o con hidroxiapatita (Sundaram et al., 2008), indican que el aumento de la concentración de quitosano al doble no modificó sustancialmente las interacciones del grupo carbonilo de la gelatina con el quitosano. Otro de los picos característicos fue el que apareció en 1560cm^{-1} , correspondiente al amido II del quitosano. Este pico aparece desplazado a la derecha (mayor energía), tal y como propone Van de Velde (Van de Velde and Kiekens, 2004) el cual postula este desplazamiento en función de como se haya producido la deacetilación de la quitina para dar quitosano. En esta mezcla no se vio la banda del amino de la gelatina descrita en 1537cm^{-1} para las mezclas realizadas a partir de quitosano al 1% (Yin et al., 1999; Cheng et al., 2003b), probablemente porque se encontraba formando enlaces de hidrógeno internos, indicando que en este caso el

aumento de la concentración de quitosano sí modifico la funcionalidad del grupo amino de la gelatina. Se observó el pico correspondiente a los $-\text{CH}_2$ de la estructura sacarídica del quitosano en 1407cm^{-1} . Dos picos observados en $1318\text{-}1377\text{cm}^{-1}$, asignables a deformaciones de los enlaces $-\text{NH}$ y $\text{C}-\text{CH}_3$, se pueden corresponder, aunque desplazados a la derecha, con aminoácidos de la gelatina (Kim et al., 2005a; Sundaram et al., 2008). Por último cabe resaltar la banda típica de la estructura en anillo en 1150cm^{-1} y las bandas entre $895\text{-}1059\text{cm}^{-1}$ asociadas a las estructuras sacarídicas y del anillo de glucopiranosas.

La mezcla *quitosano + PLL* (**Figuras 31D y 32**) presentó una estructura similar a la del quitosano, aunque los picos de vibración de sus enlaces aparecen ligeramente desplazados. El pico de los grupos $-\text{OH}$ y $-\text{NH}$ libres, en 3286cm^{-1} , es similar al resto de compuestos expuestos hasta ahora, y las deformaciones de los enlaces $-\text{CH}$ se encuentran desplazadas hacia la izquierda, en $2848\text{-}2908\text{cm}^{-1}$, es decir, que vibran con una energía menor, indicando que hay menos enlaces de hidrógeno en el interior de la molécula y que su estructura es menos ordenada. La banda a 1640cm^{-1} se correspondió con el grupo amido I del quitosano (Kim et al., 2006) o el amido I de la PLL (Babic et al., 2008) aunque ligeramente desplazado con respecto a lo descrito, indicando que existió interacción iónica entre los grupos de ambos compuestos. El pico a 1568cm^{-1} se correspondió con el grupo amido II del quitosano (Focher et al., 1992) pero no apareció el pico del amido II de la PLL descrito entre 1502cm^{-1} y 1539cm^{-1} (Babic et al., 2008), probablemente porque se encontraba formando enlaces iónicos con las moléculas de quitosano. Apareció la banda del enlace $-\text{CH}_2$ de la estructura sacarídica del polisacárido en 1408cm^{-1} , y las deformaciones del enlace $\text{C}-\text{H}$ en 1356cm^{-1} que podría corresponderse con la energía de vibración típica de la PLL descrita entre $1300\text{-}1350\text{cm}^{-1}$ (**Figura 31F**) o los enlaces $\text{N}-\text{H}$ del quitosano (Focher et al., 1992). No apareció el pico de la PLL correspondiente a las deformaciones del enlace $\text{C}-\text{H}$ entre $1400\text{-}1450\text{cm}^{-1}$ (**Figura 31F**). En frecuencias inferiores se presentaron los picos correspondientes a los enlaces $\text{C}-\text{O}$ del anillo sacarídico en 1138cm^{-1} y los de la estructura glucopiranósica en 1014cm^{-1} .

En la mezcla de los tres componentes, *quitosano + gelatina + PLL* cabe destacar el desplazamiento a la derecha de las bandas correspondientes a los grupos $-\text{OH}$ y $-\text{NH}$, en 3079 , 3300 y 3457cm^{-1} , indicando que vibran a energías más altas lo que se traduce en una mayor organización de su estructura al haberse formado más enlaces de hidrógeno

entre ellas, promovido probablemente por la mayor presencia de grupos -NH que aporta la PLL y los grupos -OH y -NH de los aminoácidos terminales de la gelatina (**Figuras 31E y 32**). Cabe resaltar el desplazamiento a la izquierda (menor energía vibración) del amido I tal y como ocurrió con el resto de mezclas del quitosano, apareciendo el pico a 1636cm^{-1} con respecto a la que aparece en el quitosano solo (1685cm^{-1}), indicando la presencia de interacciones iónicas moleculares entre los distintos componentes mezclados con el quitosano. Aparece claramente la banda del amido II en 1560cm^{-1} y los picos de las deformaciones del -NH y C-CH₃, donde una de las bandas coincide con las observadas en la gelatina (1399cm^{-1}), probablemente asignables a los grupos carboxilo de los aminoácidos de la gelatina. Nuevamente se observaron las bandas típicas del anillo sacarídico en 1159cm^{-1} y las frecuencias de los anillos de glucopiranososa.

Podemos concluir que, en general y salvo ciertas modificaciones en las interacciones por puentes de hidrógenos o fuerzas de Van der Waals de los grupos -OH y -NH libre, que desplazaron los picos de frecuencia hacia la izquierda (menor energía de vibración) o hacia la derecha (mayor energía de vibración), indicando una mayor o menor organización de la molécula, ni el quitosano, la gelatina, ni la PLL sufrieron alteraciones químicas importantes, basándose las modificaciones en interacciones de tipo electrolítico.

4.3.2.3. Espectroscopía RAMAN

Esta técnica es complementaria a la espectrofotometría infrarroja, ya que permite identificar grupos funcionales (enlaces químicos) según los niveles de energía vibracional de las moléculas. Se basa en el análisis de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromática. La mayoría de los fotones de luz son dispersados con la misma energía con la que inciden (*dispersión elástica*), pero hay una pequeña fracción que se dispersa con una energía diferente, produciendo una *dispersión inelástica*. El efecto Raman es aquel en el cual los fotones dispersados lo hacen a una frecuencia mayor a la incidente, produciéndose una transferencia de energía desde la molécula hasta el fotón. Los picos de absorción Raman de los carbohidratos se corresponden prácticamente en su totalidad con los detectados por FTIR (Cael et al.,

1974), lo que nos permitió identificar los distintos tipos de enlaces con estos espectros al tener el quitosano una naturaleza sacarídica.

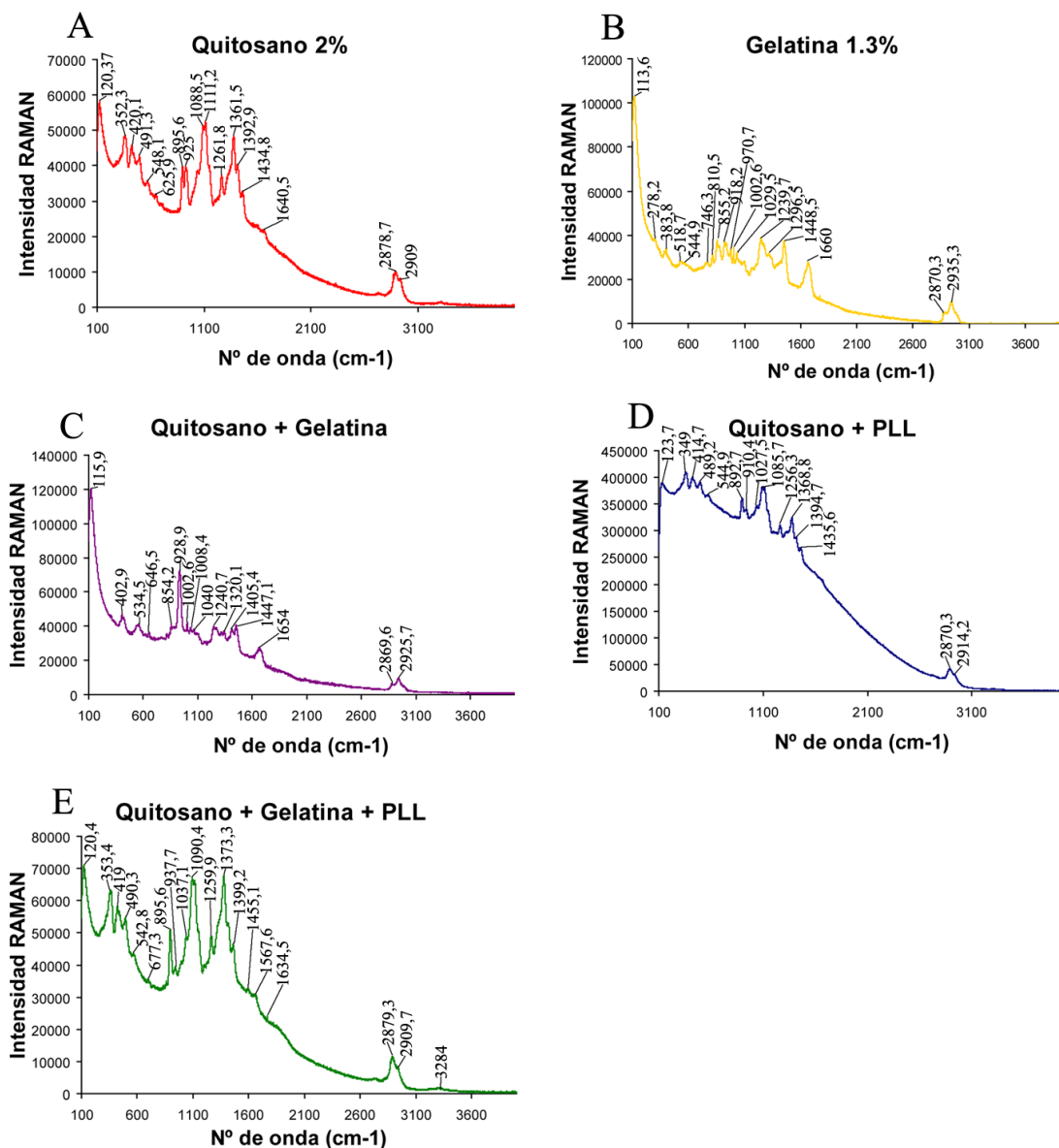


Figura 33: Espectrofotometría RAMAN. Se muestran los picos de absorción por vibración molecular al hacer incidir sobre las muestras un haz de luz monocromático de 785nm.

Todos los compuestos y sus mezclas mostraron un pico en torno a 2870-80cm⁻¹ (Figura 33), típico de las vibraciones por tensión o alargamiento de los enlaces metileno –CH (Monteiro et al., 1999). Sin embargo, el pico superior, que representa la interacción entre grupos –CH intracadena con –CH terminales, sí mostró desplazamiento en algunas muestras. En el *quitosano 2%* y *quitosano + gelatina + PLL* este pico se observó a 2909cm⁻¹,

mientras que en el *quitosano* + *PLL* se desplazó hasta 2914cm^{-1} , probablemente debido a la interacción entre los grupos $-\text{CH}$ de la *PLL* con el quitosano. La *gelatina 1.3%* mostró este pico en 2953cm^{-1} y se desplazó a 2925cm^{-1} cuando se mezcló con el quitosano. Por tanto, en lo que a grupos metilo se refiere, existió una interacción entre el quitosano con la *gelatina* y con la *PLL* cuando se mezclaron por separado, mientras que cuando se mezclaron los tres no se produjo tal desplazamiento, indicando que la *gelatina* y la *PLL* podrían haber interaccionado entre sí pero no con el quitosano. La deformación del grupo $-\text{CH}_2$ del *quitosano 2%*, descrita en 1436cm^{-1} (Fang et al., 2001), apareció como un pico en 1434cm^{-1} , mientras que el pico en 1392cm^{-1} se asoció a la energía por deformación de los enlaces $-\text{CH}$ (Wang et al., 2006). Apareció un pico acusado en 1361cm^{-1} probablemente asociado a vibraciones en los grupos $-\text{NH}$. Por último cabe resaltar la aparición de tres picos que se asocian a la estructura sacarídica en anillo del quitosano en 1261 , 1111 , 925 y 895cm^{-1} (**Figura 33A**). En la *gelatina 1.3%* aparecieron los picos de los grupos amido I y III de la proteína en 1660 , 1448 y 1239cm^{-1} (**Figura 33B**), tal y como se ha descrito previamente (Frushour and Koenig, 1975). En frecuencias inferiores vibran las estructuras aromáticas, en este caso los aminoácidos como la prolina, que vibra en 1029cm^{-1} , la fenilalanina en 1002cm^{-1} , o el anillo de prolina en 918 y 855cm^{-1} , aunque también se pueden identificar los enlaces C-C del anillo en 970cm^{-1} (Frushour and Koenig, 1975). La mezcla de *quitosano* + *gelatina* (**Figura 33C**) mostró una interacción entre los grupos amido I de ambos compuestos al aparecer una banda en 1654cm^{-1} , que vibró con una frecuencia intermedia entre las del quitosano y la *gelatina* por separado. En este caso, el grupo amido II de la *gelatina* apareció en 1447cm^{-1} , y se pudo detectar la interacción entre los grupos $-\text{CH}_2$ ya que los picos de vibración de estos enlaces, que se observaron en 1405 y 1320cm^{-1} , aparecieron desplazados respecto al quitosano y la *gelatina* por separado. La banda del amido III de la *gelatina* absorbió a 1240cm^{-1} y un pico pequeño en 1002cm^{-1} fue asignado a la fenilalanina de la *gelatina*. Los picos de estructuras aromáticas observados a 928 y 854cm^{-1} pueden corresponder a ambos compuestos. La mezcla de *quitosano* + *PLL* produjo un aumento considerable en la intensidad Raman detectada, lo que hace pensar en que hubo una fuerte interacción química entre ambos compuestos (**Figura 33D**). Aparecieron picos similares a los encontrados en el quitosano en 1435 , 1394 , 1368 y 1256cm^{-1} , indicando la presencia de los grupos característicos de este compuesto. El último de estos picos, a 1256cm^{-1} está desplazado con respecto al del quitosano solo, indicando que pudo haber interacción

con los grupos -NH de la PLL. Nuevamente se observaron los picos del anillo aromático del quitosano en 1085 , 910 y 892cm^{-1} . La última de las mezclas, la de *quitosano + gelatina + PLL* (**Figura 33E**) mostró un espectro Raman muy similar al del quitosano solo. Aparecieron dos pequeños picos en 1634 y 1567cm^{-1} indicando interacción entre grupos amido I de los tres componentes, y un pequeño pico en 1259cm^{-1} que también apareció en la mezcla *quitosano + PLL* y que podría ser característico de la PLL. El resto fue similar a lo observado en quitosano solo, salvo pequeños desplazamientos que podrían ser debidos a la interacción entre los grupos funcionales del anillo aromático del quitosano con los aminoácidos de la gelatina.

4.3.2.4. Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (ATG) estudia la estabilidad térmica de un material y la fracción de componentes volátiles en función de los cambios de peso que tienen lugar cuando se calienta una muestra. Las medidas se llevaron a cabo en dos tipos de atmósfera: i) oxidativa, donde se analizó la combustión de los materiales, midiéndose la temperatura de oxidación (T_{ox}), que define la temperatura en que se produce la mayor pérdida de peso de las muestras, y la masa residual (M_{res}) que define la masa que queda después de haberse producido la combustión; ii) atmósfera de N_2 o no oxidativa, donde se miran las pérdidas en peso de las muestras según su transformación en carbono (pirólisis), registrándose los datos de T^a en que se observa máxima pirólisis (T_{pir}) y la masa residual de carbono ($M_{\text{res-C}}$).

El análisis ATG en aire (**Figura 34**) mostró un primer pico que refleja una pequeña pérdida de peso, nunca superior al 6%, asociado a la pérdida de agua de la muestra que ocurre en torno a los $40\text{-}70^\circ\text{C}$. El análisis de las muestras indicó que el *quitosano 2%* (**Figura 34A y F**) es el menos estable, quemándose a las temperaturas más bajas, con una $T_{\text{ox}} = 203,19^\circ\text{C}$. Al final del proceso de combustión quedó un 15% de residuo (cenizas), procedente de las trazas de material inorgánico presente en el quitosano. La *gelatina 1.3%* (**Figura 34B y F**) tuvo la $T_{\text{ox}} = 538,07^\circ\text{C}$, que, además de ser la T^a a la que se perdió más peso, fue también la T^a a la que se produjo la combustión completa de la proteína, de modo que no quedó masa residual. Además de este punto, apareció otro pico de una fuerte pérdida en peso a $263,74^\circ\text{C}$, indicando que la estructura proteica de la gelatina se descompone en dos pasos.

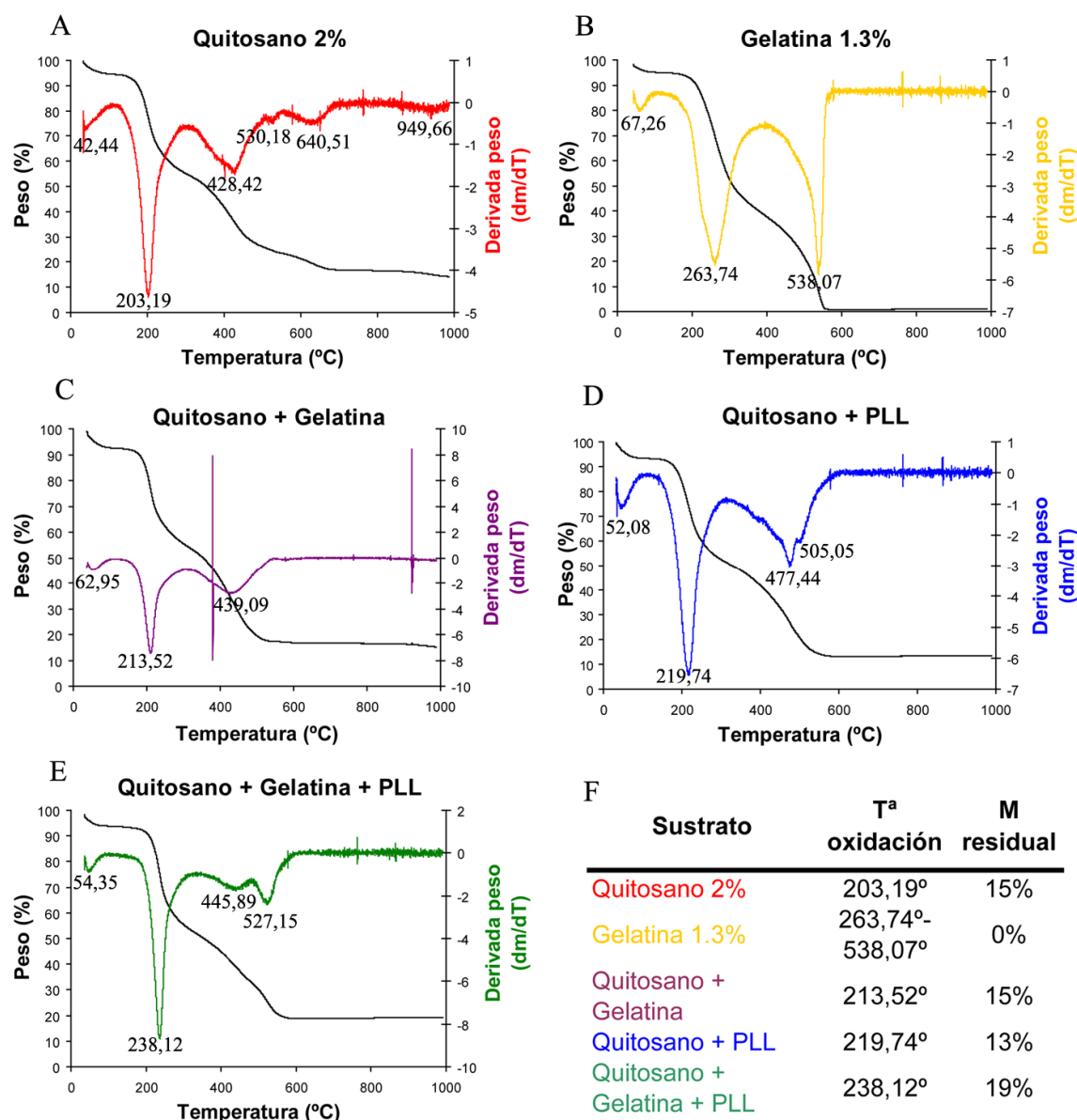


Figura 34: Análisis termogravimétrico en atmósfera oxidativa de cada polímero y las mezclas. Se representa la temperatura de oxidación o T^a de degradación máxima y la masa residual, o masa de compuesto que permanece tras completar la combustión (correspondiente al material inorgánico de la muestra (F)).

Las mezclas, sin embargo, presentaron un comportamiento intermedio entre estos dos compuestos. El *qitosano + gelatina* (**Figura 34C y F**) tuvo la T_{ox}= 213,52°C, indicando que la presencia de gelatina aumentó la estabilidad del qitosano y disminuyó la de la gelatina. En esta mezcla desaparecieron los picos de degradación a 530,18 y 640,51°C, observados en el qitosano, indicando que la gelatina interaccionó con el qitosano hasta producir una estructura con un solo pico a 439,99°C de pérdida máxima de peso.

Nuevamente apareció un residuo de cenizas del 15% en peso de la muestra, procedente de materia inorgánica del quitosano. La mezcla de *quitosano* + *PLL* (**Figura 34D y F**) mostró una $T_{ox} = 219,74^{\circ}\text{C}$, similar a la de la mezcla *quitosano* + *gelatina*, indicando la existencia de una interacción entre la PLL y el quitosano que estabiliza térmicamente al compuesto, de manera similar a la gelatina. Aparecen a continuación dos picos de degradación a $477,44$ y $505,05^{\circ}\text{C}$ que están desplazados a la derecha con respecto al quitosano, mostrando nuevamente que la PLL estabiliza al polisacárido. Por último, la mezcla de los tres compuestos, *quitosano* + *gelatina* + *PLL* (**Figura 34E y F**) produjo un aumento de la estabilidad referido a $T_{ox} = 238,12^{\circ}\text{C}$, intermedia a los compuestos por separado aunque superior al del *quitosano* + *gelatina* y *quitosano* + *PLL*, indicando que hubo interacción entre los tres componentes que aumentó su estabilidad. Esto también se observó en el pico cercano a 400°C , que se desplazó a la derecha con respecto al quitosano solo, apareciendo en $445,89^{\circ}\text{C}$. Sin embargo, aquí apareció un pico a $527,15^{\circ}\text{C}$, cercano al observado en quitosano al 2%, indicando que la gelatina y la PLL interactuaron entre sí, haciendo aparecer de nuevo este pico de degradación asociado al quitosano. Estas dos últimas mezclas presentaron también un porcentaje de M_{res} del 13% para *quitosano* + *PLL* y del 19% para el *quitosano* + *gelatina* + *PLL*, asociados ambos a productos inorgánicos del quitosano.

Como estudio complementario se realizó el ATG en N_2 de todas las muestras (**Figura 35**). El comportamiento pirolítico de las muestras fue similar al de combustión. Nuevamente el material menos estable fue el *quitosano* 2% (**Figura 35A y F**), con una $T_{pir} = 209,74^{\circ}\text{C}$, y el material más estable fue la *gelatina* 1.3% (**Figura 35B y F**), con una $T_{pir} = 275,70^{\circ}\text{C}$. En este caso, la gelatina no tuvo dos picos de degradación pirolítica, como ocurrió con la combustión, pero en este caso sí que se formó un residuo del 9% del peso total, correspondiente al carbono formado a partir de la proteína. La mezcla *quitosano* + *gelatina* (**Figura 35C y F**) mostró dos picos, el de $T_{pir} = 214,06^{\circ}\text{C}$, indicando que la gelatina mejoró la estabilidad del quitosano, y otro en $465,6^{\circ}\text{C}$ que podría indicar una interacción química entre los dos componentes que produjo una mejora en la estabilidad térmica de los dos compuestos. La mezcla de *quitosano* + *PLL* (**Figura 35D y F**) también fue más estable que el quitosano solo, con una $T_{pir} = 220,37^{\circ}\text{C}$ y con la aparición de otro pico importante a $490,64^{\circ}\text{C}$, indicando nuevamente que hubo interacción química entre el quitosano y la PLL cuya degradación química en ausencia de oxígeno se completó en dos fases de temperatura. Por último, la mezcla de *quitosano* + *gelatina* + *PLL* (**Figura 35E**

y F) mostró un único pico, correspondiente a la T_{pir} , de 241,96°C, indicando que la mezcla de los tres compuestos aumentó la estabilidad del quitosano y produjo una interacción entre la gelatina y la PLL que provocó la desaparición del segundo pico pirolítico en torno a los 400-500°C pero mejorando sustancialmente la temperatura de degradación máxima.

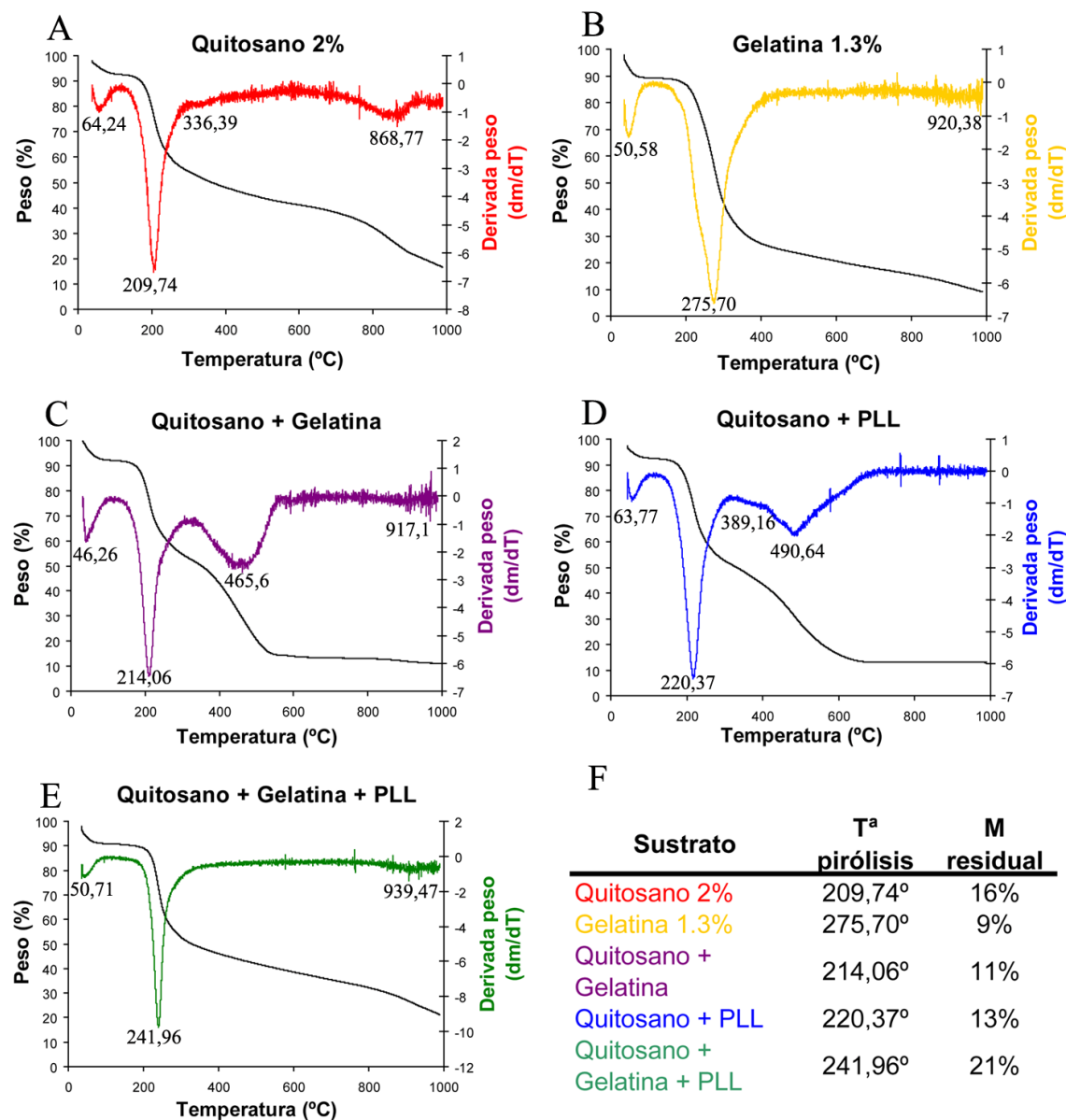


Figura 35: Análisis termogravimétrico en atmósfera no oxidativa (atmósfera de N_2). Se muestra la pirólisis de cada material. En F se representa la temperatura de pirólisis o T^a donde se produce la caída más brusca de peso, y la masa residual que representa la formación de carbono.

Por tanto, las mezclas del quitosano, tanto con la gelatina como con la PLL, mejoran la estabilidad térmica del material, siendo en todo caso la mezcla de los tres componentes la que mayor estabilidad dio al quitosano, lo que se corresponde con la estructura única y regular que se observó por SEM.

4.3.2.5. Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC), como técnica complementaria a la ATG, permitió observar también la estabilidad térmica de las muestras. En este caso, se pone la muestra en una cápsula y se compara con otra de referencia. Lo que se registra es el calor que es necesario agregar a la muestra o a la referencia para mantener ambas a la misma temperatura. A medida que se aumenta la T^a aparecerán picos positivos o negativos, correspondientes a procesos endo- o exotérmicos. En los procesos endotérmicos están incluidos la fusión, vaporización, sublimación y desorción de la muestra, mientras que los procesos exotérmicos suelen representar transiciones cristalinas o reacciones químicas.

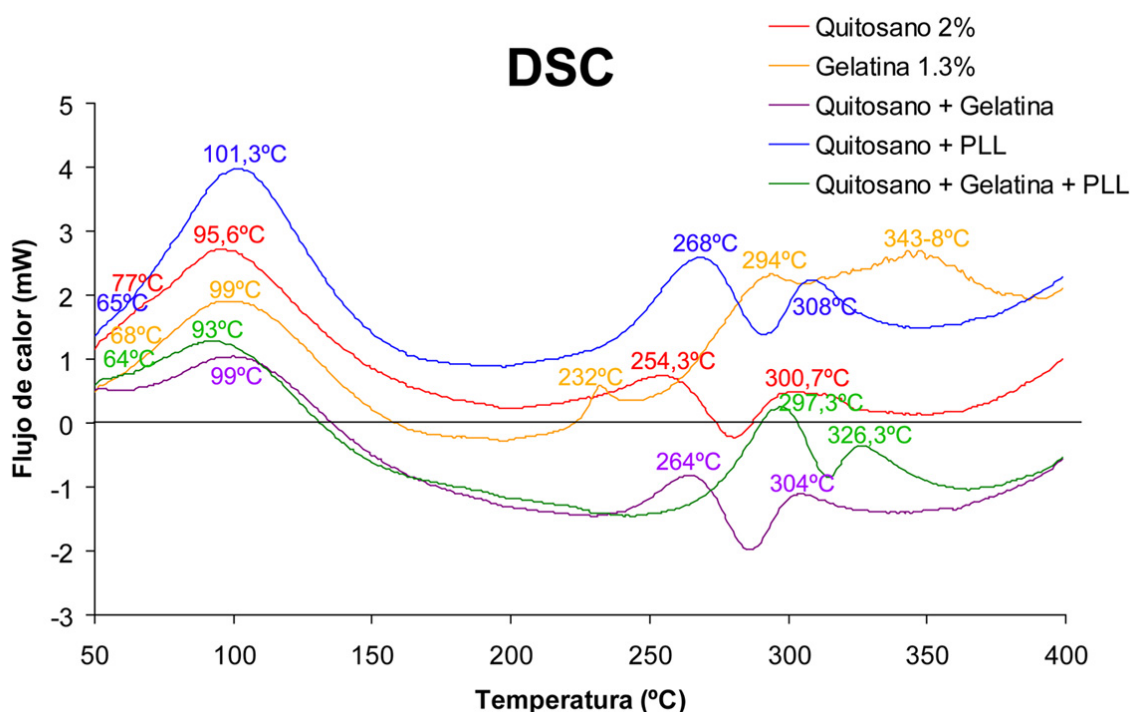


Figura 36: Calorimetría diferencial de barrido de las mezclas del quitosano con gelatina y PLL. La primera inflexión de la curva que indica una transición vítrea, seguida de un pico endotérmico que señala la pérdida de agua. El resto de picos representan diversos procesos de pirólisis de cada material.

Lo primero que se observa es una pequeña inflexión de la curva que indica un proceso de transición vítrea de los materiales (**Figura 36**), que oscila en torno a los 65°C para todos los materiales excepto para el *quitosano 2%*, que está desplazado hacia los 77°C. Esta inflexión no se observó en la mezcla *quitosano + gelatina*, indicando que la gelatina interactúa con el quitosano de modo que no sufre esta transformación. A continuación se observó un pico positivo (proceso endotérmico) que muestra la evaporación del agua de las muestras. En todos los casos la temperatura de evaporación del agua es similar, aunque se podría resaltar una mayor estabilidad para las muestras con gelatina, indicando que la proteína retiene más agua y, por lo tanto, se necesita más calor para eliminarla. Los picos que aparecen por encima de 200°C en las 4 muestras con quitosano representan distintos procesos de pirólisis del material, ya que, por encima de esta temperatura está descrito que el quitosano se encuentra totalmente degradado (bdel-Fattah et al., 2007). En estas temperaturas, todas las muestras con quitosano mostraron dos picos pirolíticos, mientras que la *gelatina 1.3%* mostró 3. Sin embargo, los procesos que tuvieron lugar en las distintas mezclas fueron diferentes. Así, el *quitosano 2%* sufrió dos picos pirolíticos endotérmicos en 254 y 300°C, mientras que en el *quitosano + PLL* los picos endotérmicos aparecieron desplazados a mayores temperaturas, indicando que la PLL interaccionó con el quitosano haciendo de éste un compuesto más estable. Por otra parte, las dos mezclas con gelatina sufrieron procesos diferentes. De este modo, el *quitosano + gelatina* mostró los dos picos de pirólisis pero como procesos exotérmicos y desplazados a temperaturas mayores, mientras que el *quitosano + gelatina + PLL* presentó un primer pico endotérmico a 297,3°C y luego otro exotérmico a 326,5°C. En esta mezcla, el hecho de que el primer pico vuelva a ser endotérmico se achaca a la presencia de la PLL y a su posible interacción con la gelatina, mientras que el segundo pico no se revirtió aunque se desplazó a temperaturas inferiores, indicando nuevamente la existencia de otro tipo de interacción entre la gelatina y la PLL.

En este caso, y aunque los procesos cambiasen de endo- a exotérmicos, la mezcla de los tres componentes fue la más estable, tal y como se vio en los estudios ATG.

4.3.2.6. Porosimetría por adsorción-desorción de nitrógeno

Con esta técnica se estudia la superficie y tipo de poros que tiene un material mediante la obtención de las isothermas de adsorción-desorción de N₂ a temperatura

constante de 77,35°K (-196°C), sometiendo la muestra a distintas presiones de intrusión del N₂. Las isothermas de adsorción-desorción de N₂ permiten caracterizar los poros pequeños, es decir, los denominados microporos (menores de 2nm) y los mesoporos (entre 2 y 50nm) pero no permite identificar los poros grandes o macroporos (mayores de 50nm). Existen 6 tipos diferentes de isothermas, recogidas en los estudios realizados por Brunauer (1940), que van a definir el tipo de poros que presenta un material: 1) *isothermas tipo I*, que definen estructuras fundamentalmente microporosas; 2) *isothermas tipo II*, que definen estructuras no porosas; 3) *isothermas tipo III*, asociadas normalmente a estructuras no porosas o microporosas; 4) *isothermas tipo IV*, asociadas a estructuras mesoporosas; 5) *isothermas tipo V*, asociadas a sólidos micro- y mesoporosos; 6) *isothermas tipo VI*, que definen estructuras con capas monomoleculares no porosas (**Figura 37**).

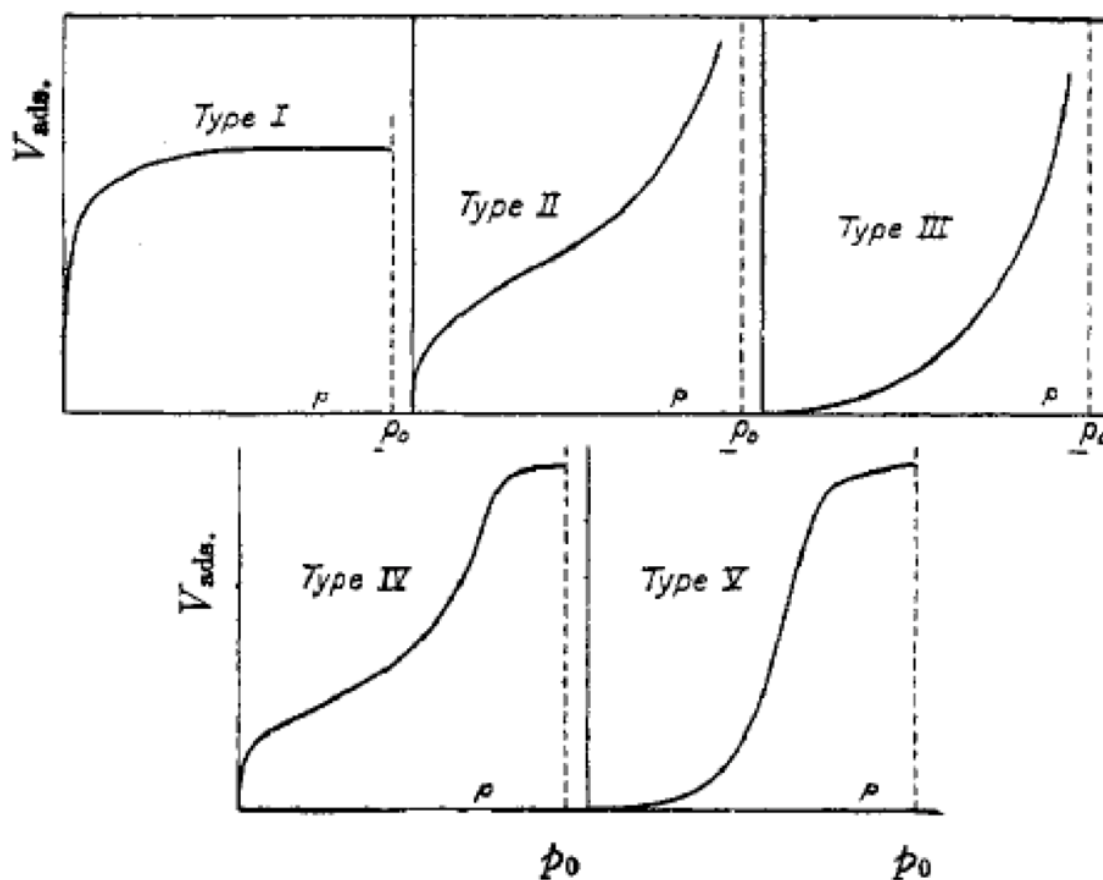


Figura 37: Tipos de isothermas de adsorción de gases de van der Waals. (Tomado de Brunauer,S; Deming,L.S.; Deming,E.; Teller,E. (1940). On a theory of the van der Waals adsorption of gases. *J.Am.Chem.Soc.* 62:1923-1732).

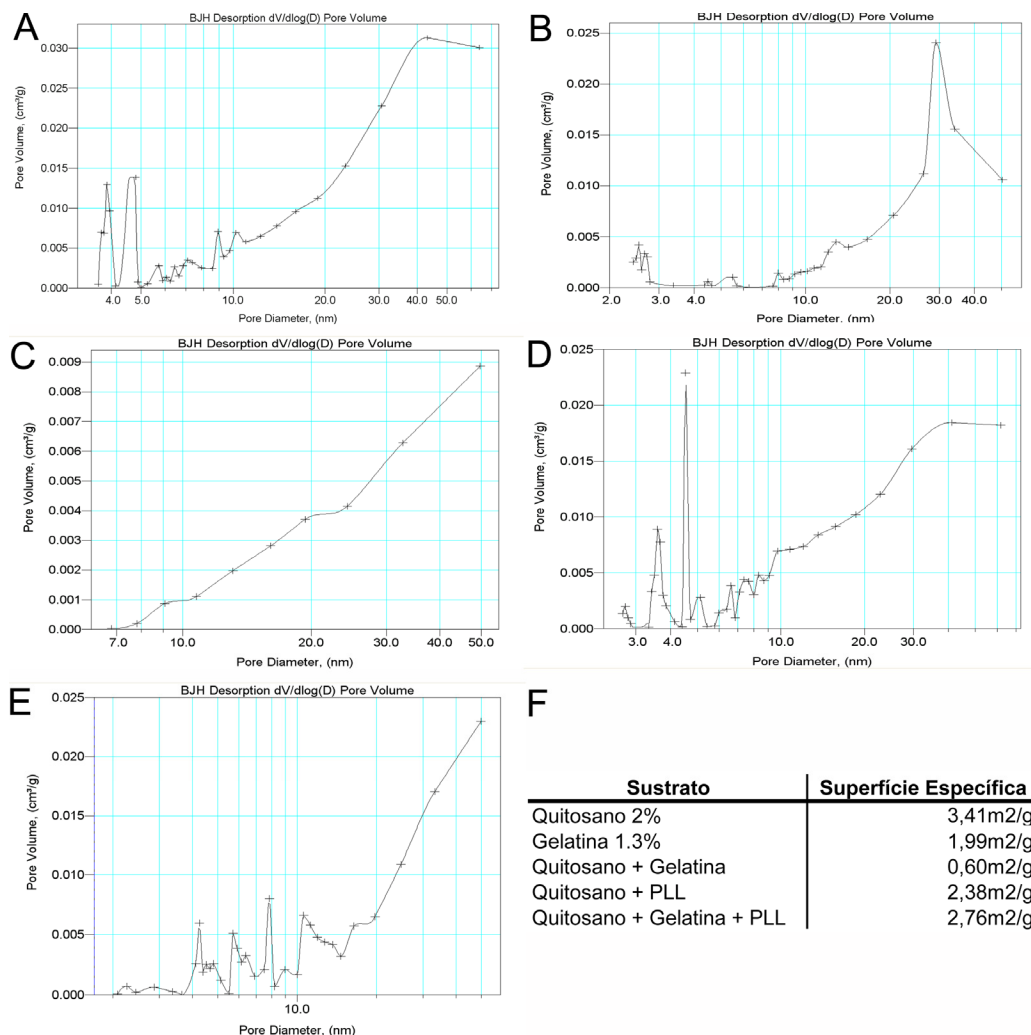
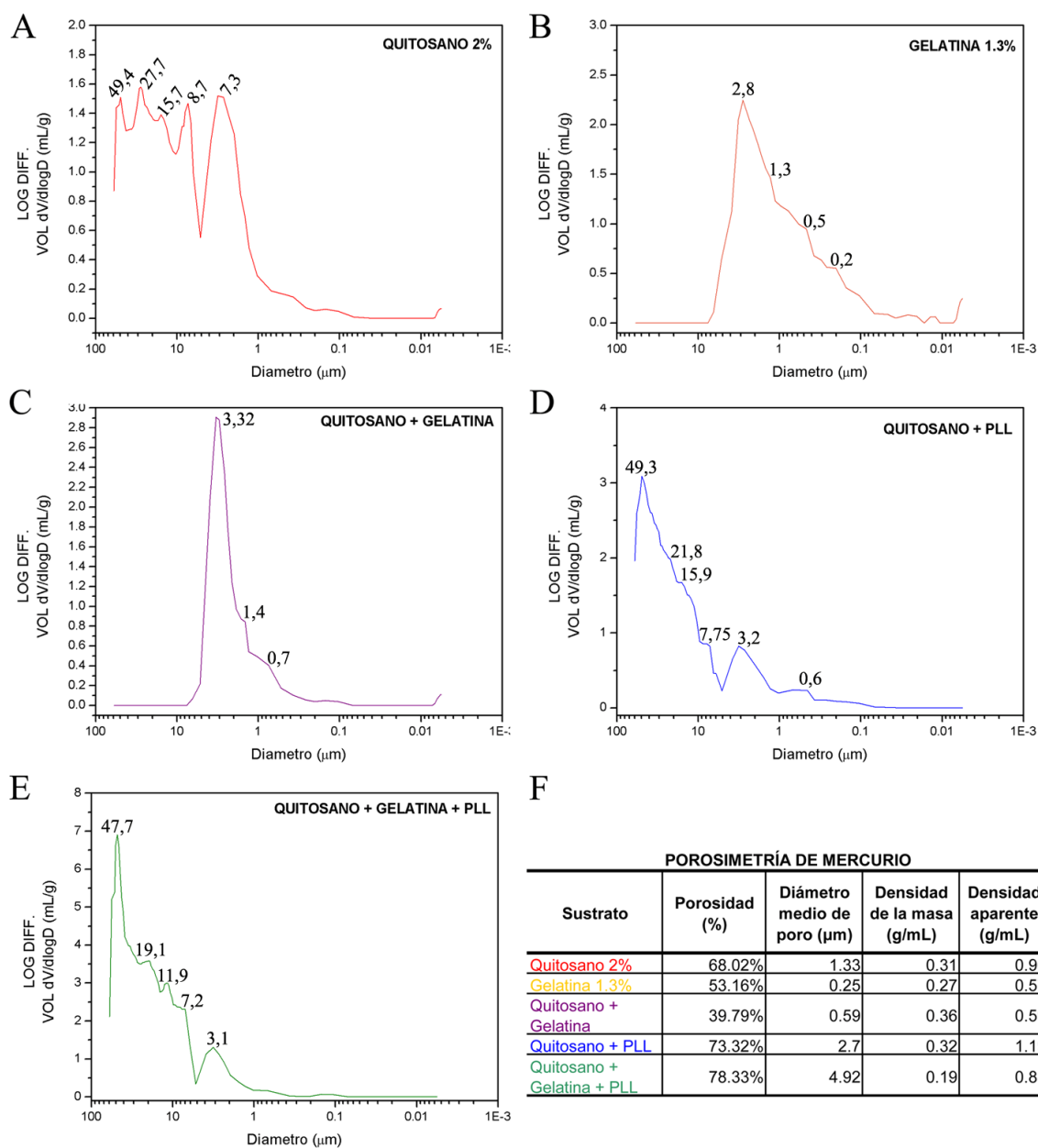


Figura 38: Isotermas de adsorción-desorción de N_2 de las mezclas de quitosano con gelatina y PLL. Se comprobó que todos los materiales poseían una estructura macroporosa. Se calculó la superficie específica (SE) de cada muestra (F), observando que la mayor SE se correspondió con el quitosano, mientras que el *quitosano + gelatina* es el que tiene la SE más baja, siendo el menos poroso.

En este estudio las 5 muestras ensayadas dieron lugar a *isotermas de tipo III*, caracterizadas por ser convexas con respecto al eje de presión (eje x). En este caso, cuando se hizo la derivada de las isotermas se vio que en los 5 casos tendían a subir a partir de los 30-40nm de diámetro de poro, indicando que los 5 compuestos son estructuras macroporosas (**Figura 38**). A partir de estas isotermas se calculó la superficie específica (SE) de cada material, la cual define la superficie (en m^2) de material expuesta por unidad de masa (en gramos). Los cálculos, representados en la **Figura 38F** muestran que el *quitosano 2%* presentó la mayor SE, indicando que era el más poroso, mientras que la mezcla *quitosano + gelatina*, con una $SE=0,6m^2/g$, presentó la estructura menos porosa.

Esto se corresponde con lo observado mediante SEM, donde esta mezcla fue la que presentó una estimación del diámetro interno de sus poros más pequeña.

4.3.2.7. Porosimetría por intrusión de mercurio



Esta técnica permite la caracterización del sistema poroso de los materiales, obteniéndose a partir de ella la distribución porosa en función del tamaño aparente de acceso a los poros. El ensayo porosimétrico consiste en inyectar mercurio a presión y registrar el volumen de mercurio absorbido. Para cada intervalo de presión considerado, el volumen de mercurio absorbido indica el volumen de poros de la muestra que tienen un determinado intervalo de tamaño de acceso.

El este estudio, la intrusión de mercurio mostró que el *quitosano* 2% tiene macroporos de múltiples tamaños, presentando una curva denominada multimodal (**Figura 39A**). Se observó un rango de poro desde las 49,7 μ m hasta las 7,3 μ m (más predominantes), indicando que presenta una estructura porosa irregular con un diámetro medio de poro de 1,3 μ m y una porosidad del 68% (**Figura 39F**). La *gelatina* 1.3% presentó el menor tamaño de poro, con un diámetro medio de 0,25 μ m y una distribución de los poros trimodal (tres tamaños de poro) con predominancia de los tamaños de 2,8; 0,5 y 0,2 μ m (**Figura 39B y F**). Sin embargo la porosidad fue relativamente alta (53,1%), indicando que es una estructura porosa de poros pequeños. Aunque la porosidad fue menor que la del quitosano, el gel que constituye esta proteína presentó una densidad aparente (densidad cercana a la real) muy baja, con 0,57g/mL, indicando que presentaba menor cantidad de masa por unidad de volumen que el quitosano. La mezcla de *quitosano* + *gelatina*, presentó una estructura diferente. El porcentaje de porosidad disminuyó prácticamente a la mitad con respecto al *quitosano* 2%, situándose en 39,8% (**Figura 39F**), lo que indicó que la gelatina interaccionó con el quitosano reduciendo considerablemente la porosidad y el diámetro de los poros del gel. Estas observaciones respaldan las observaciones del estudio mediante SEM donde esta mezcla fue la que presentó los poros más pequeños, siendo el sustrato más compacto. La distribución de los poros de esta mezcla resultó ser trimodal, con un tamaño de poro predominante de 3 (**Figura 39C**). Estos datos apuntan a que la mezcla del quitosano con la gelatina dio lugar a un incremento de las interacciones electrostáticas entre ambos compuestos que fueron las responsable de la compactación observada con estas técnicas aunque reduciendo la densidad del quitosano a valores similares a los de la gelatina de 0,59g/mL (**Figura 39F**). La mezcla de *quitosano* + PLL indujo la formación de poros de mayor tamaño que presentaron también una distribución trimodal (**Figura 39D**) con tamaños predominantes de 49,3; 3,2 y 0,6 μ m. La interacción de la PLL con el quitosano produjo un aumento considerable de la porosidad (73,3%) y del diámetro medio con

2,7 μ m (**Figura 39F**). La interacción entre el quitosano y la PLL indujo, además, un aumento considerable de la densidad aparente del gel, con 1,19g/mL. Por último, la mezcla de *quitosano + gelatina + PLL* fue la más porosa, con un 78,3% de porosidad y con los poros de mayor diámetro (4,92 μ m) (**Figura 39F**). La distribución de sus poros fue multimodal, como en el quitosano solo, con predominancia de los poros con un tamaño medio de 47,7 μ m y los de 3,1 μ m (**Figura 39E**). Estos resultados respaldan nuevamente el estudio por SEM, que mostró que esta mezcla poseía los poros más grandes. El paso a una distribución de poro multimodal, como la del quitosano, indica que hubo interacciones exclusivas entre la gelatina y la PLL.

Por tanto, concluimos que al igual que lo observado con las otras técnicas de análisis físico-químico, existió una interacción entre el quitosano tanto con la gelatina como con la PLL, y una interacción entre la gelatina y la PLL que se tradujo en modificaciones de la estructura, morfología y porosidad de las mezclas. En todos los casos se observó que la mezcla de *quitosano + gelatina* fue la menos porosa y más compacta lo que se tradujo en mejoras adhesivas como veremos a continuación.

4.3.3. Evaluación de las mezclas en estudios *in vitro*

4.3.3.1. Ensayos de supervivencia y proliferación basados en MTT

Ensayos con NEURONAS

Este estudio se realizó cultivando neuronas de corteza e hipocampo de ratas embrionarias cultivadas sobre las distintas superficies y analizando su actividad metabólica tras 1, 4, 7 y 14 días en cultivo. Con las neuronas únicamente se evaluó el aumento en la tasa de actividad metabólica en los distintos sustratos. La ausencia de división neuronal se comprobó contando el número de células mediante la tinción nuclear con Hoechst y con ayuda del software ImageJ v1.39q (datos no mostrados).

El análisis conjunto de los datos mostró efectos dependientes del tipo neuronal ($F(1, 222)=7.0019$; $p<0.01$). Las neuronas corticales mostraron, a igual número de células, tasas metabólicas superiores a las neuronas de hipocampo (**Figura 40A**). También se observó un aumento significativo ($F(3,222)=145.34$; $p<0.01$) de la actividad metabólica a con el tiempo en cultivo, indicando viabilidad más alta en los pocillos con mayor adhesión

celular (**Figura 40B**). Además también se encontraron diferencias significativas ($F(6,222)=2.235$; $p<0.05$) entre los tiempos y los distintos tipos de sustrato (**Figura 40C**), siendo las superficies de las placas, con o sin PLL (controles positivos de crecimiento), las óptimas para la supervivencia y actividad neuronal, mientras que las mezclas de los distintos biomateriales mostraron una actividad metabólica menor. Cabe destacar como los dos tipos neuronales tuvieron un comportamiento similar en las diferentes superficies de cultivo, aunque sí se detectaron ligeras diferencias dependiendo del tipo neuronal ($p<0.05$).

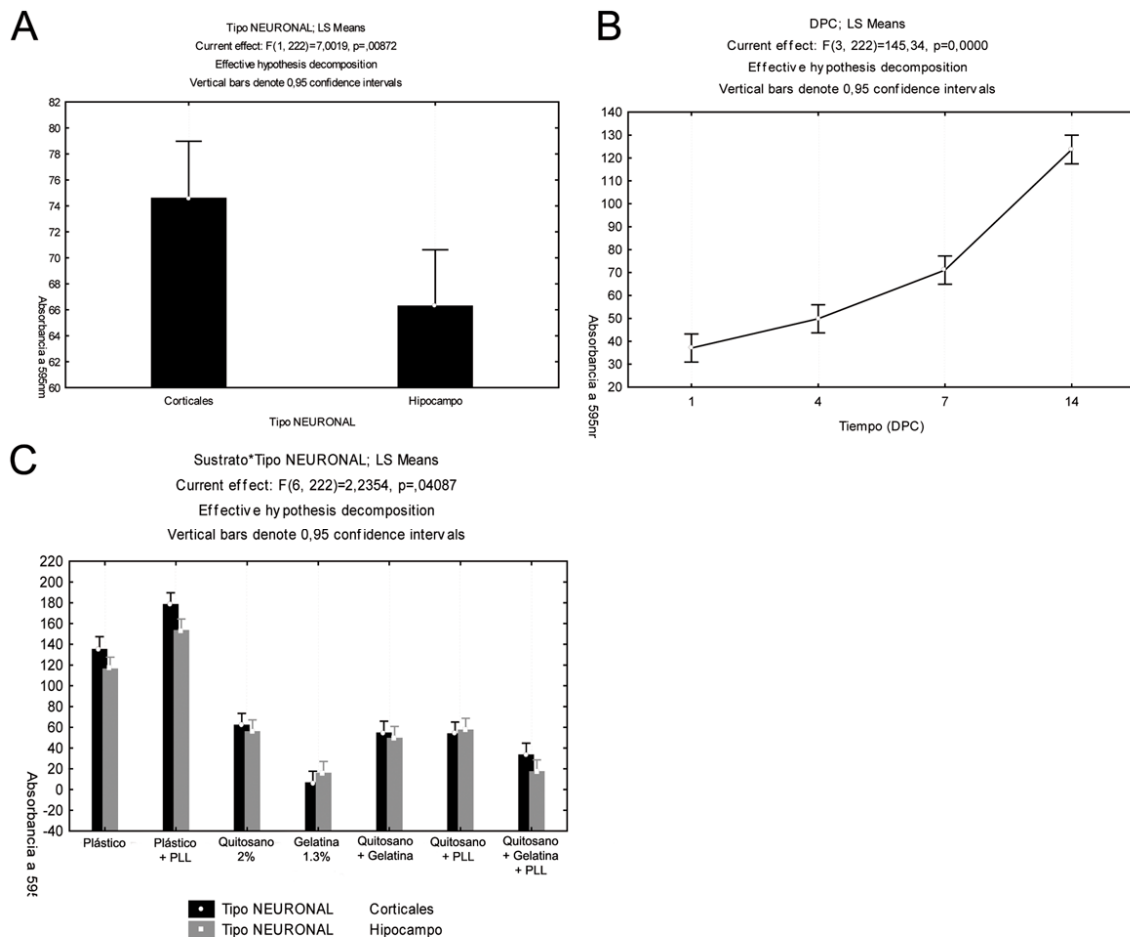
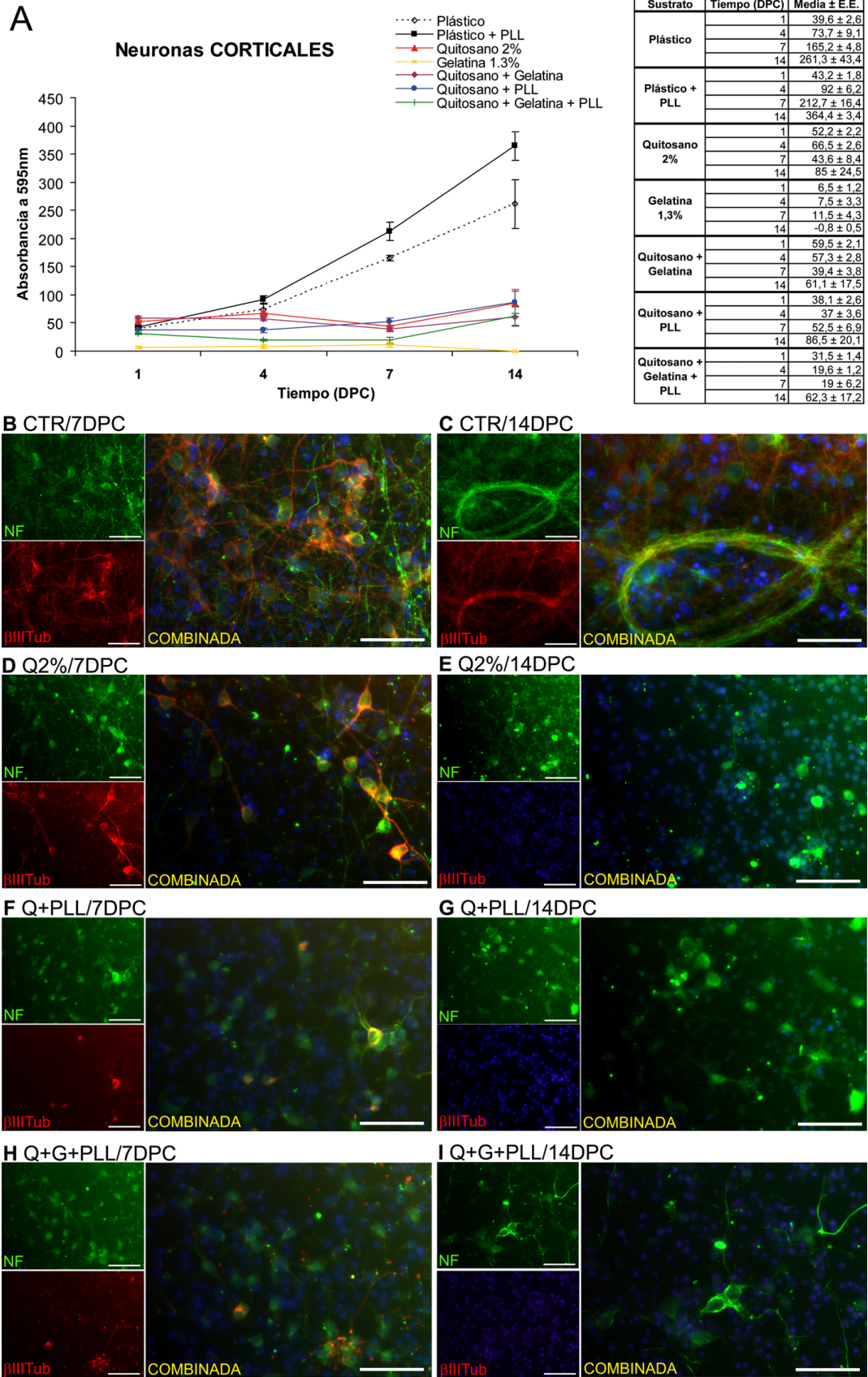


Figura 40: ANOVA de la absorbancia de los ensayos de MTT para neuronas corticales y de hipocampo. Se observaron significativas entre los dos tipos neuronales, resultando más viables las neuronas corticales (A); también se observó un aumento significativo de la viabilidad a medida que transcurría el tiempo de cultivo (B); comparando ambos tipos neuronales se observó que el comportamiento en las distintas superficies fue similar, con valores máximos en los controles (C).

A continuación se muestran los datos para cada tipo neuronal por separado:.

Las neuronas corticales presentaron una viabilidad muy alta en los pocillos control (*plástico* y *plástico* + *PLL*), donde los valores de MTT aumentaron significativamente ($p < 0.01$) entre los días 1 y 14 de cultivo, observándose un incremento de aproximadamente 6,5 veces en el *plástico* y 8,5 veces en el *plástico* + *PLL* (**Figura 41A**). Este fuerte incremento de la actividad metabólica neuronal no fue detectado en el resto de superficies construidas con los distintos biomateriales, aunque los distintos sustratos mostraron efectos sobre su viabilidad neuronal ($F(6,110)=111.41$; $p < 0.01$). También se observaron diferencias entre los 4 tiempos de estudio ($F(18,110)=25.096$; $p < 0.01$), traducidas en ligeros aumentos y disminuciones de la actividad metabólica. Estas diferencias también afectaron la expresión de los dos marcadores neuronales utilizados en este estudio. Así, en ninguna de las superficies se vio marcaje para la proteína β III-tubulina a 1 día de cultivo. La expresión de esta proteína comenzó a ser detectable a partir del cuarto día en cultivo, exceptuando en el *quitosano* 2%, donde comenzó a expresarse a partir del séptimo día, y en *quitosano* + *gelatina*, donde nunca llegó a expresarse. Sin embargo, el marcaje para las proteínas de los neurofilamentos del citoesqueleto se observó en todas las neuronas y a todos los tiempos (**Figura 41**).

Entre todos los sustratos, la *gelatina* fue la que afectó más negativamente a la viabilidad neuronal, induciendo muerte celular. Esta muerte se tradujo en una caída paulatina de los valores de MTT hasta desaparecer a los catorce días en cultivo, indicando la desaparición a ese tiempo de todas las neuronas (**Figura 41A**). En el resto de sustratos, que contenían *quitosano*, se registraron ligeras disminuciones de la actividad metabólica desde el comienzo de su cultivo hasta el día 7, aunque en todos ellos se recuperaron los valores en el día 14 debido, probablemente, al tiempo que requieren las neuronas para adherirse a los sustratos. Al final del tiempo de estudio, todos los sustratos mostraron valores de MTT similares, sin diferencias significativas entre ellos, indicando que la mezcla del quitosano con la gelatina, la PLL o con ambos, no indujo mejoras en la viabilidad de este tipo neuronal, siendo ésta, además, significativamente menor a la de las superficies *control*. Aún así, de entre todas estas mezclas, las que no llevaban gelatina fueron las que mejor se comportaron. Esta observación, junco con las observaciones previas en *gelatina* 1.3%, indica que la proteína promueve peor la adhesión y supervivencia de las neuronas corticales.



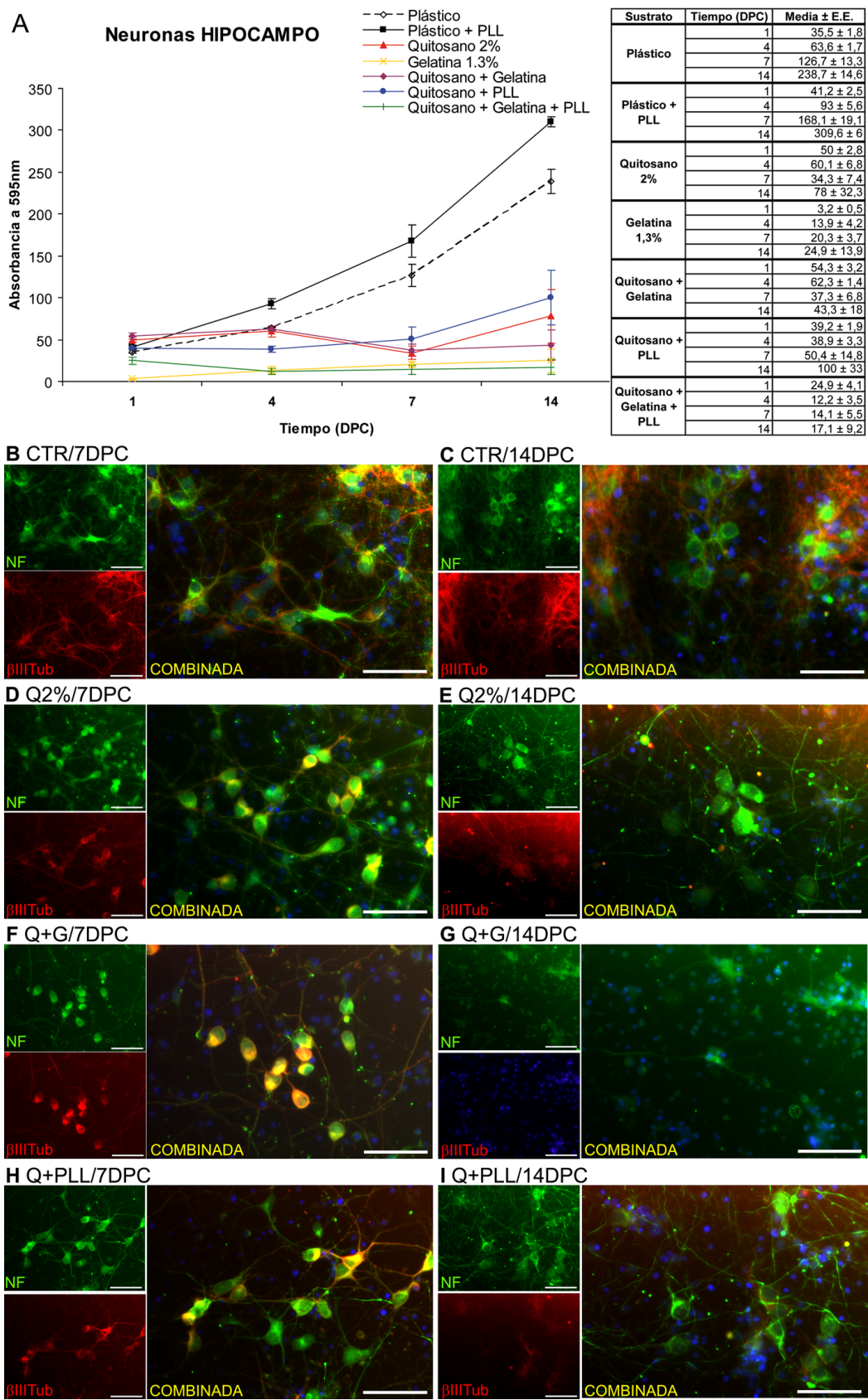
Con el marcaje inmunocitoquímico realizado se pudieron comprobar estos extremos y el aspecto que presentaron las células sobre alguno de los sustratos. En los pocillos control de *plástico + PLL* se observó una alta densidad celular y las neuronas emitieron procesos celulares largos, positivos en unos casos a β III-Tubulina, en otros para NF, o para ambos a la vez (**Figura 41B y C**), indicando una alta actividad metabólica. En este caso, las neuronas fueron emitiendo procesos neuríticos que llegaron a invadir la práctica totalidad del fondo de la placa tras 7 días (**Figura 41B**), llegando a asociarse en paquetes de fibras tras 14 días (**Figura 41C**). En el resto de sustratos la densidad celular fue menor, lo que se tradujo en una actividad metabólica menor y, por lo tanto, en valores de absorbancia de MTT más bajos. En todos ellos se comprobó que las neuronas expresaban los dos marcadores utilizados tras 7 días en cultivo (**Figura 41D, F y H**), mientras que el marcador β III-Tubulina desapareció a las dos semanas en las mezclas con quitosano, permaneciendo en el quitosano sin mezclar (**Figura 41E, G e I**).

Por lo tanto, comparados con los controles, todos los biomateriales construidos con *quitosano*, y especialmente los que no contenían *gelatina*, fueron relativamente buenos sustratos para la adhesión y viabilidad de algunas de las neuronas corticales. Teniendo en cuenta que las neuronas no se dividen, se puede concluir que las superficies control promueven favorablemente la adhesión neuronal, lo que se traduce en aumentos de las tasas de actividad metabólica con el paso del tiempo, mientras que las superficies con quitosano permiten la adhesión únicamente de una parte de las neuronas, manteniendo estable su actividad metabólica. De todas las superficies, aquellas que no contenían *gelatina* fueron las más permisivas, aunque tras 14 días en cultivo no se vieron diferencias estadísticamente significativas ni en su viabilidad ni en la expresión de los marcadores neuronales utilizados en este estudio, apuntando a la idoneidad de todas ellas.

Figura 41: Ensayos de viabilidad e inmunocitoquímicas de neuronas corticales creciendo sobre las mezclas de quitosano con gelatina y PLL. Los estudios de viabilidad muestran un incremento progresivo en las dos superficies control, permaneciendo el resto con valores similares tras dos semanas de cultivo. Una excepción fue la *gelatina*, donde no se produjo adhesión neuronal ni supervivencia (A). En las imágenes, representación del marcaje para Neurofilamentos (verde) y β III-Tubulina (rojo) en las superficies control de *plástico + PLL* (B y C), en el *quitosano 2%* (D y E), en el *quitosano + PLL* (F y G) y en el *quitosano + gelatina + PLL* (H e I) tras 7 y 14 días en cultivo. Se observa el número y cantidad de neuritas en los pozos control que es superior al del resto de superficies. Las neuritas se agruparon en paquetes gruesos tras 14 días en cultivo, expresando conjuntamente ambos marcadores. En el resto de superficies, el marcador β III-Tubulina se perdió tras 2 semanas excepto en las superficies de *quitosano 2%*. En todas las superficies la densidad celular fue menor a la de los controles, lo que se tradujo en unas tasas de actividad metabólica menores. (En los ensayos de MTT se representa la media \pm error estándar de $n = 5$. En las imágenes, barras de 50 μ m).

Las neuronas de hipocampo se comportaron de manera similar a las corticales. Los pozos control fueron, nuevamente, los que mostraron mejor adhesión y donde la viabilidad fue superior, mostrando diferencias significativas con el resto de superficies a partir del 4 día de cultivo (**Figura 42A**). Como comentamos anteriormente, este tipo neuronal también mostró un aumento significativo de los valores de MTT con el paso del tiempo ($F(3,112)= 59.679$; $p<0.01$) lo que indica que, allí donde las células se adhirieron, su viabilidad mejoró. En este caso también se observó un efecto intrínseco de los diferentes sustratos sobre la viabilidad neuronal ($F(6,112)=71.095$; $p<0.01$), indicando que las neuronas mostraron una respuesta diferente según cual fuera la superficie sobre la que crecían. A diferencia de las neuronas corticales, las de hipocampo se adhirieron y sobrevivieron en la *gelatina 1.3%* tras 2 semanas en cultivo, no mostrando diferencias significativas en ninguno de los sustratos, excepto en *quitosano + PLL*, en el cual la viabilidad fue significativamente superior ($p<0.01$). Este sustrato fue el que mejor promovió la adhesión y la supervivencia de estas neuronas tras 14 días en cultivo, mostrando también valores superiores y estadísticamente diferentes a los del *quitosano + gelatina + PLL*, aunque no con el *quitosano 2%* ni con el *quitosano + gelatina*. Por lo tanto, a largo plazo los mejores sustratos para la adhesión y supervivencia de las neuronas de hipocampo fueron el *quitosano 2%*, el *quitosano + gelatina* y el *quitosano + PLL*, siendo la *gelatina 1.3%* y la mezcla de los tres compuestos los que peor se comportaron.

Figura 42: Ensayos de viabilidad e inmunocitoquímicas de neuronas de hipocampo creciendo sobre las mezclas de quitosano con gelatina y PLL. La actividad metabólica en las superficies control fue significativamente más alta que en el resto de superficies, promoviendo la adhesión celular y la neuritogénesis (A). En las imágenes, marcaje para Neurofilamentos (verde) y para β III-Tubulina (rojo) tras 7 y 14 días de cultivo. A diferencia de las neuronas corticales, estas neuronas no agruparon sus neuritas en paquetes tras 14 días de cultivo, aunque sí se apreció un aumento en su grosor (B y C). La superficie de *quitosano + PLL* promovió adhesión celular con emisión de numerosas neuritas, siendo la superficie de crecimiento óptimo para estas neuronas (H e I). Las superficies de *quitosano 2%* (D y E) y las de *quitosano + gelatina* (F y G) fueron relativamente adhesivas. En todas las superficies se mantuvo la expresión de neurofilamento (verde) y una ligera expresión del marcador β III-Tubulina (rojo) excepto en la superficie de *quitosano + gelatina*, donde se perdió. (En los ensayos de MTT se representa la media \pm error estándar de $n= 5$. En las imágenes, barras de $50\mu\text{m}$).



Teniendo en cuenta estas observaciones, concluimos que la respuesta celular ante los mismos sustratos de crecimiento es distinta según el tipo neuronal del que se trate. Esto también se refleja en la expresión de los marcadores celulares, de modo que las neuronas de hipocampo no perdieron la expresión de la proteína β III-Tubulina con el paso del tiempo, exceptuando en la mezcla de *quitosano* + *gelatina*, donde se perdió completamente (**Figura 42C, E, G e I**). En este tipo neuronal no se observaron agrupamientos en gruesos paquetes neuríticos a los 14 días, aunque si se observó que en los pocillos control las neuritas eran más gruesas que en el resto de superficies (**Figura 42B y C**), indicando que su viabilidad y actividad metabólica fueron allí más altas que en el resto de superficies.

La gelatina no mostró sobre las neuronas de hipocampo los efectos negativos observados en las neuronas corticales y, tras 14 días en cultivo, hubo células adheridas y viables, aunque las mezclas que contenían gelatina fueron, nuevamente, las que peor se comportaron. La mezcla de *quitosano* + *PLL* fue la que mayor adhesión y viabilidad presentó, siendo, junto con el *quitosano* 2%, las dos superficies más promotoras de la viabilidad de las neuronas de hipocampo. En este caso, los efectos positivos de la PLL en la mezcla se vieron enmascarados cuando se añadió la gelatina, indicando que ésta bloquea los sitios proadhesivos de la PLL. Entre los dos controles ensayados, la PLL mostró un efecto promotor de la adhesión y supervivencia, ya que sus valores fueron estadísticamente superiores ($p < 0.01$) a los vistos en las superficies de *plástico* de los pocillos sin tratar. Estos datos indican que la molécula proadhesiva PLL es la principal responsable de promover la viabilidad de estas neuronas, mientras que la gelatina tiende a enmascarar sus efectos.

Ensayos con ASTROCITOS

El comportamiento de los astrocitos en las distintas superficies fue mucho más variable que el registrado en las neuronas, ya que este tipo celular tiene unos requerimientos adhesivos diferentes y, además, prolifera.

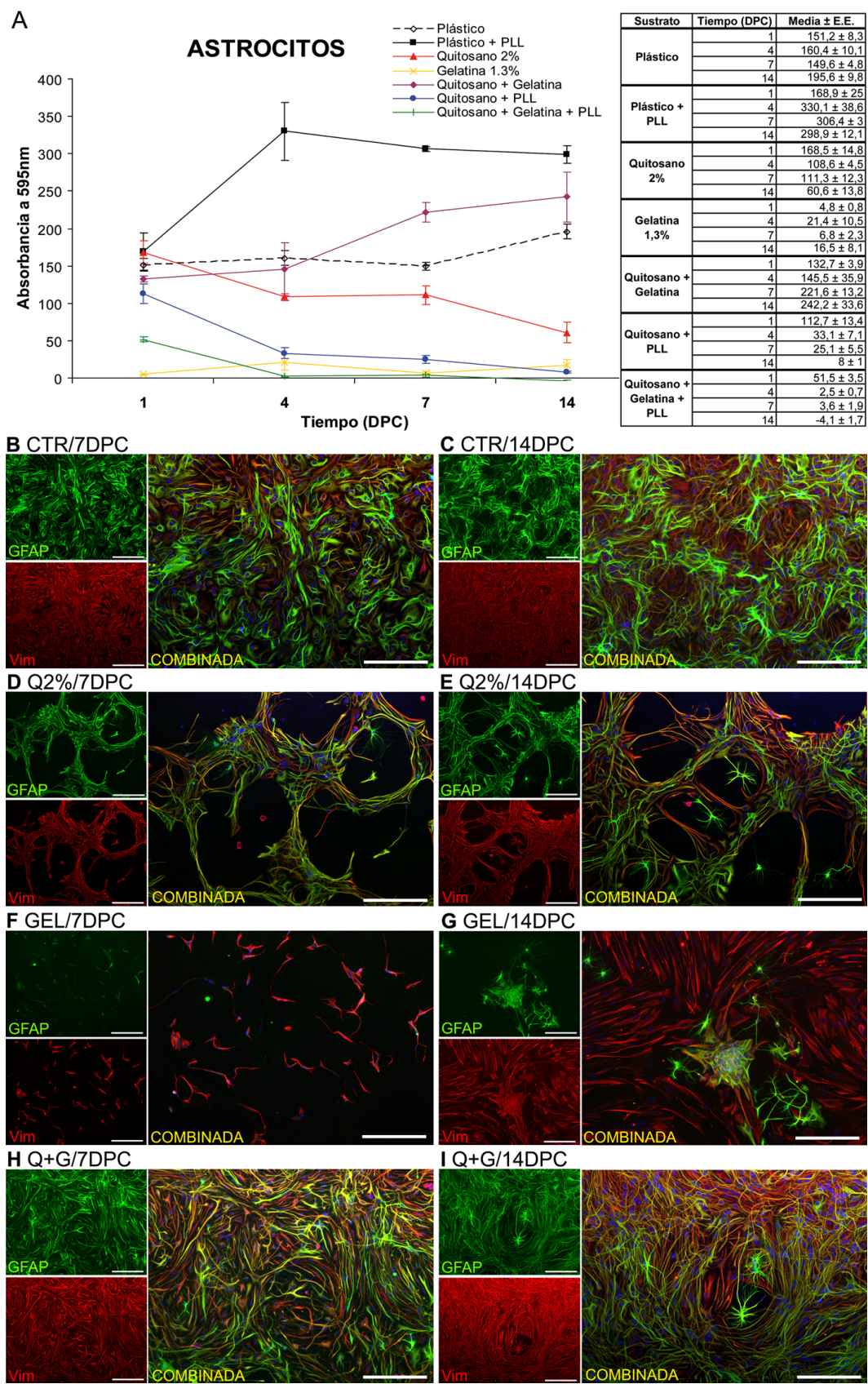
De las dos variables estudiadas, sustrato y tiempo, solamente el tipo de sustrato tuvo efecto sobre la supervivencia y proliferación ($F(6,112) = 177.59$; $p < 0.01$), indicando que las distintas superficies afectan a la viabilidad de los astrocitos. Lo primero que cabe resaltar son las diferencias entre los dos tipos de superficies consideradas control

(pocillos sin sustrato añadido), de modo que el tratamiento de los pocillos con PLL indujo incrementos significativos en las tasas de actividad metabólica celular (**Figura 43A**), indicando que esta molécula es promotora de la adhesión y proliferación de los astrocitos. De este modo, el óptimo de proliferación se consiguió en los pocillos de *plástico + PLL*, el cual, a los 14 días de cultivo, mostró diferencias significativas ($p < 0.01$) con todas las superficies excepto con una, *quitosano + gelatina*. En este caso, esta mezcla resultó ser promotora de la adhesión y la proliferación de los astrocitos, induciendo ligeros aumentos no significativos en los valores de MTT a medida que pasaba el tiempo. De este modo, esta superficie resultó ser el sustrato de crecimiento óptimo para este tipo de célula glial. Sin embargo, cuando se analizó el comportamiento de cada uno de los sustratos de la mezcla por separado, el *quitosano* y la *gelatina*, se comprobó que no se indujo proliferación de astrocitos, con valores de MTT muy bajos o incluso disminuyó la viabilidad con resultado de muerte celular, como ocurrió en el *quitosano 2%*. Con respecto a las mezclas realizadas con PLL, las tasas de proliferación fueron muy bajas o incluso nulas (como ocurrió en el *quitosano + gelatina + PLL*), indicando que estas superficies no permitieron ni la adhesión, ni la supervivencia celular. Estos datos contrastan con el comportamiento de las neuronas, para las cuales los sustratos de crecimiento óptimos fueron precisamente las mezclas con PLL. Por lo tanto, para el caso de los astrositos, la PLL induce adhesión pero cuando se usa sobre el plástico de las placas, pero la inhibe cuando se encuentra formando parte de los geles de quitosano, indicando que, o bien el quitosano, o bien la gelatina, bloquean los sitios proadhesivos de la PLL. Si se comparan estos datos con los observados para las neuronas, donde la mayor adhesión ocurrió en los sustratos con PLL, concluimos que la mezcla de PLL con quitosano y gelatina, como se observó anteriormente en la caracterización físico-química, induce cambios en los grupos químicos de su superficie, que permiten la adhesión neuronal pero dificultan la astrogial.

Por otra parte, para caracterizar correctamente los astrositos que crecen en las distintas superficies, se procedió a su inmunomarcaje con anti-vimentina y anti-GFAP, marcadores respectivos de astrositos inmaduros (Vimentina) o con fenotipo diferenciado (GFAP). El marcate reveló la existencia de células que expresaban los marcadores por separado o simultáneamente. Así, en los pocillos control (*plástico + PLL*) se observó que tras 7 y 14 días en cultivo se formó una monocapa de células positivas para vimentina con morfología poligonal, lo que sugiere la presencia de células en su forma de “blastos”

(Figura 43B y C). También se observó como tras 7 días muchas de las células expresaron también GFAP (Figura 43B), indicando diferentes estadios de diferenciación. Este efecto se acentuó con el tiempo y a los 14 en cultivo muchas de las células positivas para GFAP pierden la expresión de vimentina, creciendo sobre una monocapa de células vimentina-positivas y adquiriendo una morfología más fibrosa, con procesos celulares gruesos y fuertemente positivos para GFAP (Figura 43C). Un comportamiento similar se observó sobre la otra superficie de crecimiento óptimo, el *quitosano + gelatina*, exceptuando que la morfología de las células se hizo mucho más fibrosa y estrellada con respecto a los pozos control (Figura 43H e I). Se observaron cambios fenotípicos y morfológicos importantes en las otras dos superficies, que mostraban crecimiento moderado. Así, en el *quitosano* 2% las células se agruparon dejando entre ellas grandes espacios en los cuales aparecieron astrocitos aislados con una morfología estrellada, presentando multitud de procesos celulares finos y alargados (Figura 43D y E). Sin embargo, el crecimiento sobre la *gelatina* 1.3% mostró proliferación celular entre los días 7 y 14, y al término del experimento se formó una monocapa de células poligonales, vimentina-positivas pero GFAP-negativas que, en regiones discretas de los pocillos, rodeaban a pequeños grupos de células positivas a ambos marcadores y morfológicamente mucho más fibrosas y estrelladas (Figura 43F y G).

Figura 43: Ensayos de proliferación e inmunocitoquímicas de astrocitos postnatales creciendo sobre las mezclas del quitosano con gelatina y PLL. Se detectó un período de adhesión celular entre los días 1 y 4 de cultivo, con caídas de los valores de MTT en todos los sustratos, que continúa en todos los sustratos excepto en la mezcla *quitosano + gelatina* (A). En esta mezcla los valores se situaron, tras 14 días, cercanos a los controles con PLL, siendo promotora de la adhesión y proliferación. En las inmunocitoquímicas, se observó que, tanto los controles de *plástico + PLL* (B y C) como las superficies de *quitosano + gelatina* (H e I), promovieron la ocupación del fondo de los pocillos por las células. En ambos casos se observó que se formó un manto de células positivas para vimentina (rojo) sobre la que creció una monocapa de células fuertemente positivas tanto para vimentina como para GFAP (verde), con morfología fibrosa. En el *quitosano* 2% la viabilidad celular se fue reduciendo con el tiempo, aunque tras 14 días permanecieron agrupaciones celulares con morfología poliédrica, encerrando en algunas ocasiones a células fibrosas únicamente GFAP-positivas. En las superficies de *gelatina* 1.3% la viabilidad fue baja, aunque mejoró a los días 7 y 14 del cultivo. Este incremento, aunque pequeño, fue consecuencia mayoritariamente de una monocapa de células poligonales positivas para vimentina pero negativas a GFAP, indicando la menor actividad metabólica de estas células (En los ensayos de MTT se representa la media \pm error estándar de n= 5. En las imágenes, barras de 200 μ m).



Por tanto, las distintas superficies ensayadas afectaron a la capacidad de adhesión y proliferación de los astrocitos de forma positiva (*plástico*, *plástico + PLL* y *quitosano + gelatina*) o de forma negativa (*quitosano 2%*, *quitosano + PLL* y *quitosano + gelatina + PLL*), afectando, además, a la morfología y expresión de los marcadores típicos de estas células. De entre todas las mezclas, *quitosano + gelatina* fue la más favorecedora de la adhesión y proliferación de los astrocitos, apuntando a ésta como la óptima para su crecimiento y cultivo, resultando similar a la superficie control de *plástico + PLL* que fue la óptima de crecimiento.

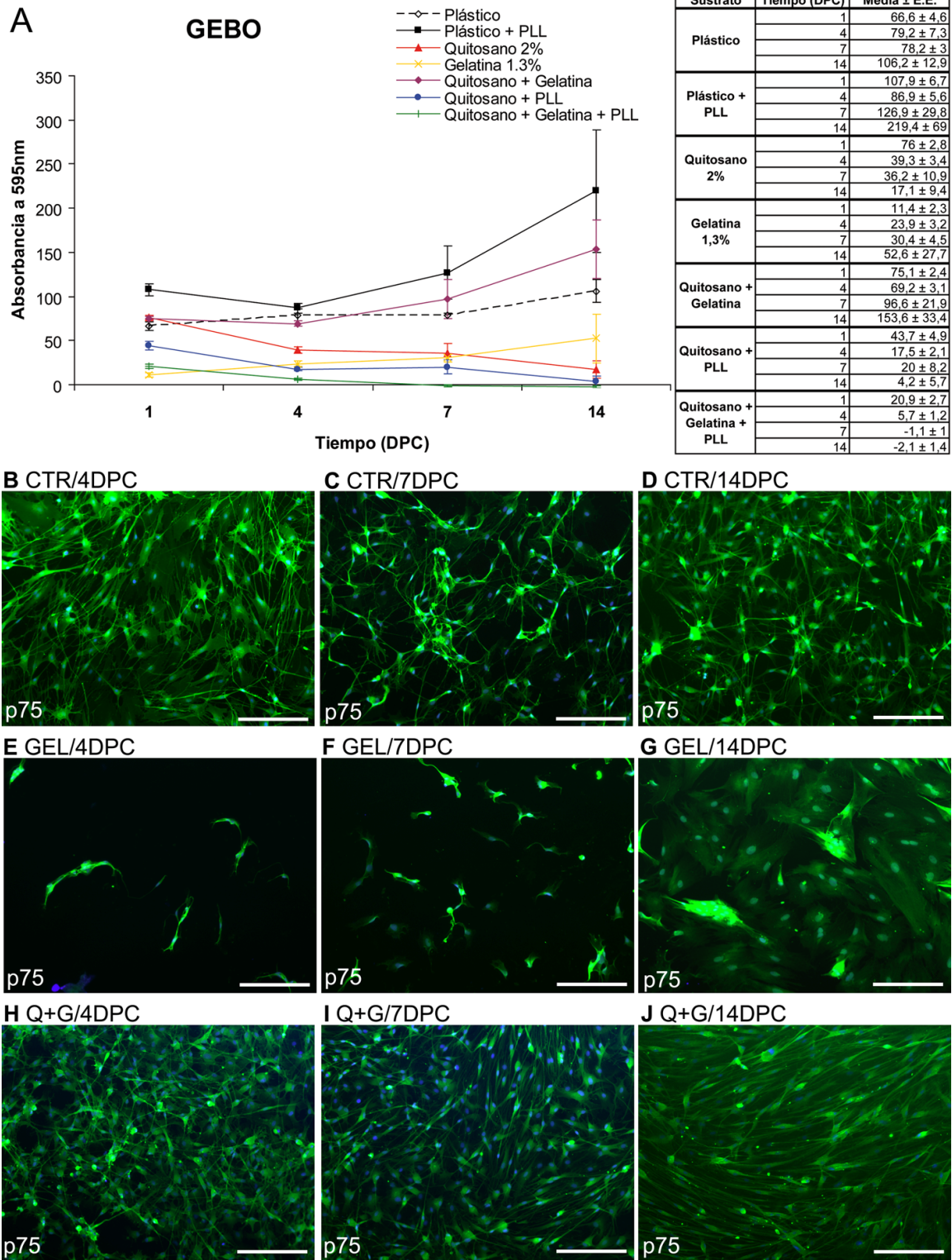
Ensayos con GLÍA ENVOLVENTE DE BULBO OLFATIVO

El estudio del comportamiento de las células de glía envolvente de bulbo olfativo (GEBO) sobre los distintos biomateriales ensayados es de radical importancia ya que estas células son susceptibles de ser utilizadas como trasplantes en lesiones medulares para promover regeneración axonal. De entre todos los candidatos, aquel en el que las células de GEBO presentaran un mejor comportamiento se consideraría un factor de importancia decisiva para elegir qué sustrato utilizar para construir puentes.

A diferencia de lo ocurrido con astrocitos, el tiempo en cultivo tuvo un gran efecto sobre las tasas de crecimiento y proliferación ($F(3,112)= 4.285$; $p<0.01$) de las células de GEBO, con un aumento acusado de los valores de MTT, principalmente, a partir del 7º día de cultivo. También se mantuvo el efecto propio de los distintos sustratos, tal y como ocurrió con las otras células estudiadas ($F(6,112)= 28.402$; $p<0.01$). La GEBO tuvo un comportamiento distintivo entre los días 1 y 4 de cultivo, en los que se puede apreciar una ligera disminución no significativa de los valores de MTT (**Figura 44A**), interpretado como el periodo necesario para que las células comiencen a adherirse y proliferar. En este caso, entre el día 1 y 4 de cultivo no se observó el aumento de la supervivencia y proliferación en los pocillos control con PLL (*plástico + PLL*) que se había observado en las otras células. A partir del 4º día, sin embargo, se produjo un aumento significativo ($p<0.01$) en la proliferación sobre esta superficie, que nuevamente dio lugar a los valores más altos. También se observó el efecto promotor de la adhesión de la PLL, porque los controles que contenían PLL fueron los que presentaron tasas de proliferación superiores, con aumento significativo ($p<0.01$) de los valores. Con respecto a las superficies con biomaterial añadido los resultados fueron mucho más variables. Entre

las dos superficies de material sin mezclar, únicamente en las de *gelatina* 1.3% se registró proliferación, mientras que en el *quitosano* 2% se produjo muerte celular, hasta prácticamente desaparecer las células tras 14 días de cultivo. Este comportamiento también se observó en las dos mezclas de quitosano con PLL (*quitosano* + PLL y *quitosano* + *gelatina* + PLL) indicando que la PLL, cuando se mezcla con el quitosano, forma una estructura que inhibe el crecimiento y proliferación de las células de GEBO. Sin embargo, cuando el quitosano se mezcló con la gelatina (*quitosano* + *gelatina*), se generó una superficie mucho más adhesiva, de modo que la GEBO pudo proliferar mucho más eficazmente que en el resto de sustratos ensayados, con valores significativamente superiores al resto de los sustratos en el día 14 de cultivo. Teniendo en cuenta que el quitosano induce muerte celular, la gelatina parece responsable de que el quitosano se torne en superficie proadhesiva. Sin embargo, como comentamos previamente, la mezcla de *quitosano* + *gelatina* + PLL indujo muerte celular, resultando ser una superficie inhibitoria. Una posible explicación a estos hechos es que la adición de PLL bloquea los sitios de adhesión que la gelatina induce en el quitosano cuando se mezclan ambos compuestos, probablemente al formar una estructura con entidad química nueva, como sugerían los análisis en el microscopio electrónico de barrido. Curiosamente, los pocillos control con PLL fueron los más adhesivos. Con estas observaciones concluimos que la PLL es una molécula permisiva y proadhesiva para las células de GEBO en las superficies de plástico de las placas, pero que, cuando se mezcla con el quitosano, los sitios de unión de la PLL quedan bloqueados y, además, bloquean los sitios de unión de la gelatina.

Solo uno de los dos marcadores inmunológicos utilizados (p75 y S100B), típicos de la GEBO, el receptor p75, fue detectado en este estudio. Mediante inmunotinción para este marcador visualizamos estas células en las distintas superficies, observándose como tras 7 días de cultivo todas las células presentaron la morfología típica de la GEBO, células multipolares con procesos alargados (**Figura 44B, E y H**). En la figura se puede observar como las células proliferan en mayor grado en los controles y en las superficies de *quitosano* + *gelatina*, donde llegan a la confluencia, ocupando la práctica totalidad del fondo de la placa a todos los tiempos. Sin embargo, en el otro sustrato donde se registró proliferación, la *gelatina* 1.3%, la densidad celular fue menor, aunque se observó como, tras 14 días en cultivo, las células ocuparon también todo el fondo de la placa.



A los 14 días, el marcaje con anti-p75 mostró los cambios morfológicos sufridos por estas células en las 3 superficies sobre las que hubo proliferación. Así, en los controles (*plástico* + *PLL*) se observaron las células ocupando el fondo de la placa de manera desorganizada, con multitud de procesos celulares alargados y entrelazados (**Figura 44C**). Sin embargo, en la *gelatina* 1.3% la totalidad de las células adheridas adquirieron una morfología aplanada, con citoplasma poligonal ocupando máximo espacio (**Figura 44G**). Por último, la superficie más promotora del crecimiento, la de *quitosano* + *gelatina*, mostró células alargadas, con dos o tres procesos celulares asociados en paquetes que, aparentemente, presentaron direccionalidad, formando grupos de crecimiento paralelo (**Figura 44J**). Este tipo de organización comenzó a ser observado a partir del 7° día de cultivo (**Figura 44I**).

En conclusión, la mezcla de *quitosano* + *gelatina* indujo respuestas de orientación en las células de GEBO, lo que, unido a su capacidad de promover la adhesión y proliferación de las mismas, lo convierte en un candidato idóneo para construir puentes y ser utilizado en modelos de lesión en los que se combinen estrategias reparadoras utilizando transplantes de GEBO.

Figura 44: Ensayos de proliferación e inmunocitoquímicas de células de glía envolvente de bulbo olfativo (GEBO) creciendo sobre las mezclas de quitosano con gelatina y PLL. El gráfico muestra que únicamente hubo proliferación en los pozos controles con y sin PLL, en el *quitosano* + *gelatina* y en la *gelatina* 1.3%, mientras que en el resto de superficies se produjo una caída de la viabilidad traducida en muerte celular (A). En las figuras se muestran las inmunocitoquímicas para p75 del crecimiento sobre los pozos control de *plástico* + *PLL* (B, C y D), sobre *gelatina* 1.3% (E, F y G) y sobre *quitosano* + *gelatina* (H, I y J), donde se observa la ocupación prácticamente completa del fondo de los pocillos que, sin embargo, se tradujo en niveles muy diferentes de actividad metabólica. Un aspecto notable fue el crecimiento celular orientado linealmente que alcanzaron las células de GEBO sobre las superficies de *quitosano* + *gelatina*, suponiendo un aspecto favorable si se buscan respuestas de crecimiento lineales. (En los ensayos de MTT se representa la media \pm error estándar de $n=5$. En las imágenes, barras de 200 μ m).

4.3.3.2. Estudio de las células por microscopía electrónica de barrido

Con esta técnica se estudio la manera en la que se adhieren las células gliales utilizadas en este estudio (astrocitos y GEBO) al material de crecimiento óptimo, el *quitosano + gelatina*, después de 4 días en cultivo.

La imagen muestra a los astrocitos con dos morfologías, una estrellada, típica de los astrocitos fibrosos y otra más aplanada, con un citoplasma más poligonal (**Figura 45A**). Estas dos morfologías ya habían sido identificadas en cultivos donde, mediante inmunocitoquímica, estas células presentaron mayor expresión de la proteína GFAP, mientras que las poligonales expresaron principalmente vimentina. Una imagen más detallada muestra como cada uno de los procesos celulares emite pequeños filopodios con los cuales se adhiere a la superficie de cultivo (**Figura 45B**). La imagen muestra que la superficie de *quitosano + gelatina* presentó una estructura lisa y homogénea.

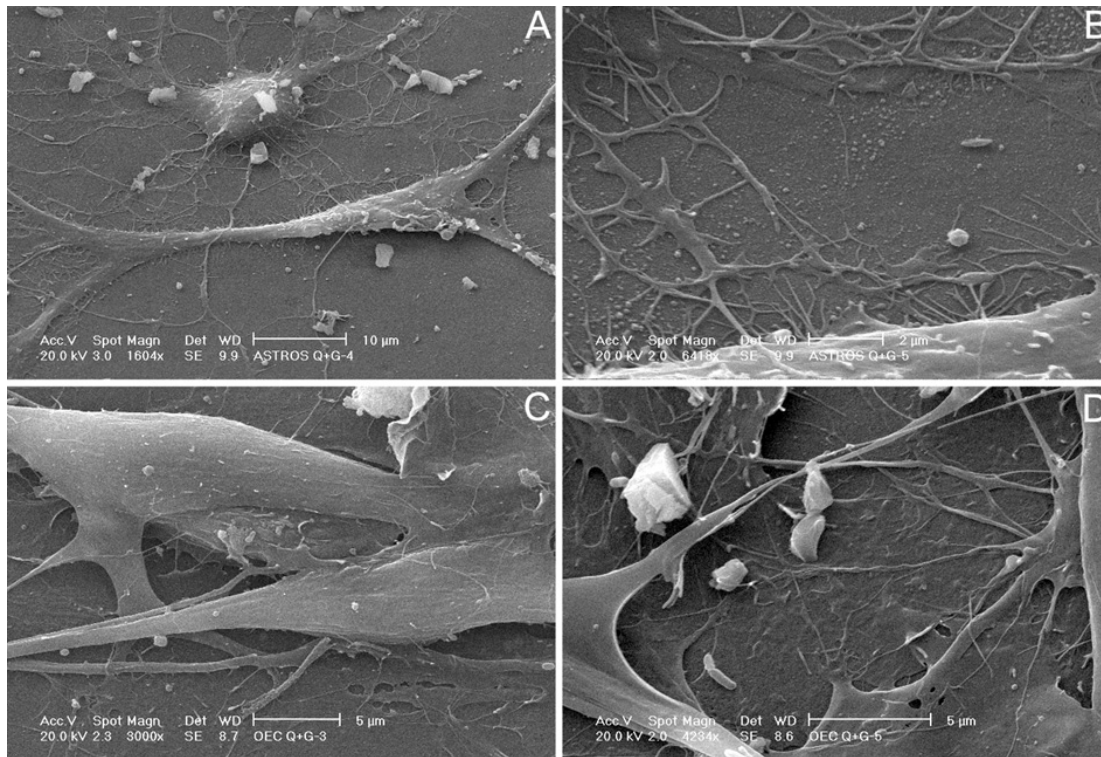


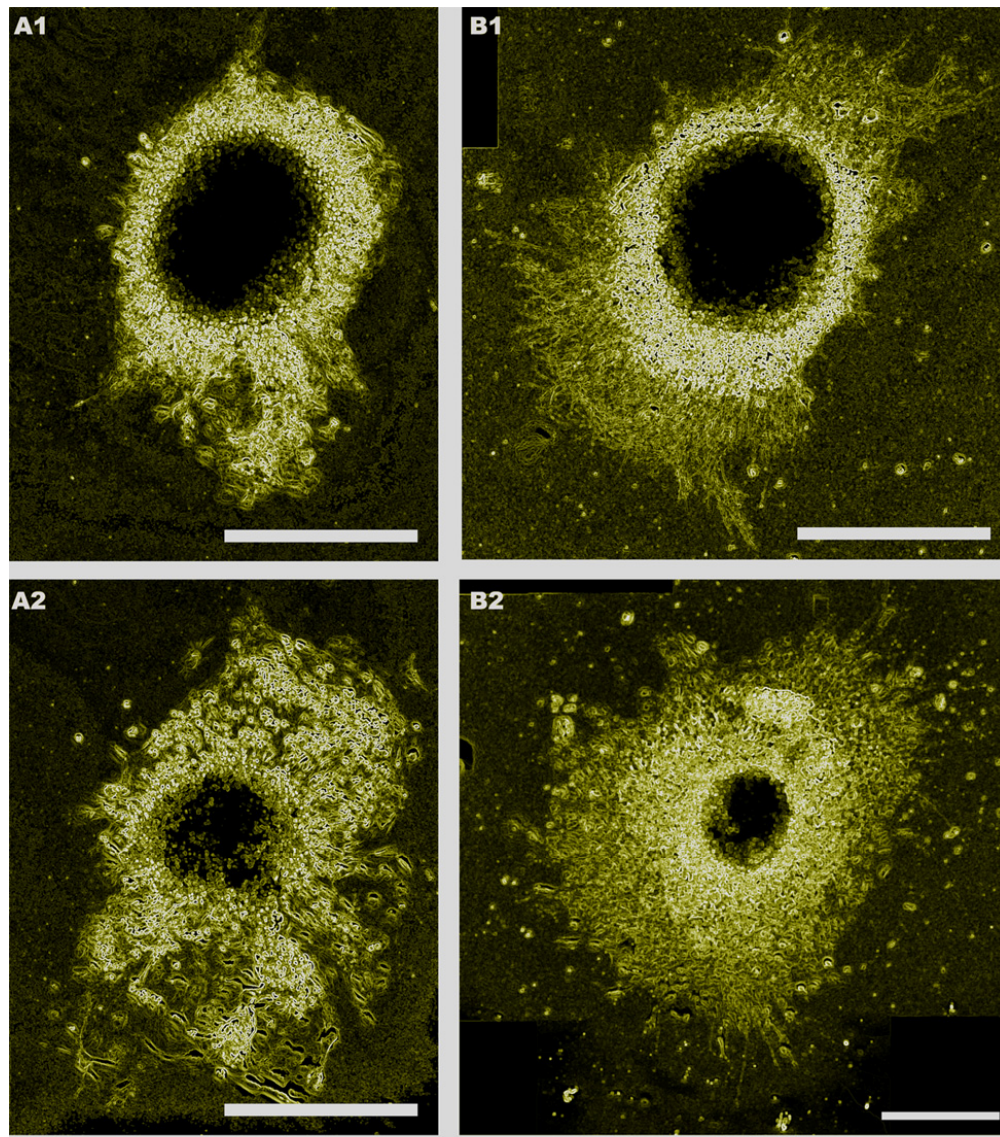
Figura 45: Astrocitos y células de glía envolvente de bulbo olfativo sobre superficies de *quitosano + gelatina* tras 4 días en cultivo. Imagen al microscopio electrónico de barrido donde se muestra la morfología estrellada de los astrocitos, emitiendo multitud de prolongaciones celulares a modo de filopodios (A y B). Las células de GEBO mantienen su morfología fusiforme, anclándose al medio con procesos celulares aplanados (C y D). (Barra de 10µm para A; 5µm para C y D; 2µm para B).

Respecto a las células de GEBO, se observó su morfología típica de células fusiformes con procesos alargados anchos, sin las ramificaciones observadas en los astrocitos (**Figura 45C**). El análisis más detallado de la estructura de estos procesos muestra que las células se adhieren a la superficies de *quitosano + gelatina* con mayores ensanchamientos citoplasmáticos, que forman como pies planos al final de las prolongaciones del cuerpo celular (**Figura 45D**).

Estos resultados muestran que una superficie de *quitosano + gelatina* es idónea para la adhesión y crecimiento óptimas de glía del sistema nervioso, como los astrocitos, y de células promotoras de la regeneración como las células de GEBO.

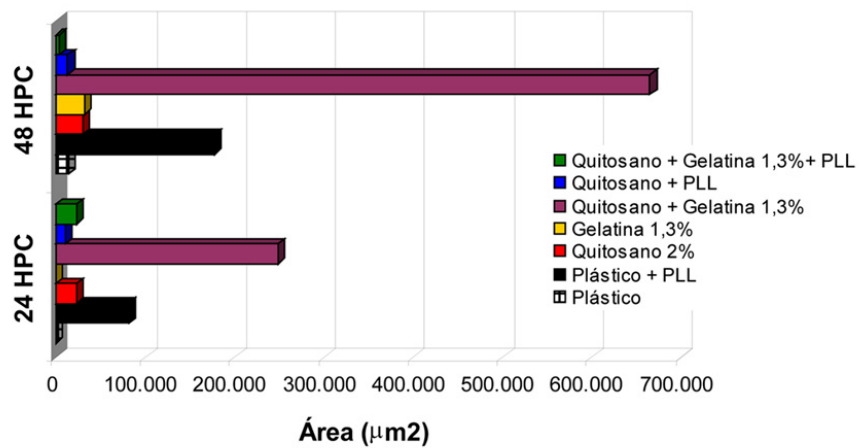
4.3.3.3. Ensayos de Extensión neurítica con ganglios de la raíz dorsal

Para analizar los sustratos preferentes para la emisión y crecimiento neuríticos, cultivamos ganglios de la raíz dorsal (GRD) sobre las distintas superficies y medimos el área relativa de extensión de las neuritas por ganglio. El análisis a los dos tiempos reveló diferencias en el área de ocupación neurítica en las distintas superficies. Así, en ninguno de los sustratos de crecimiento se superaron las $30.000\mu\text{m}^2$ de ocupación, llegando en algunos casos a no existir emisión neurítica alguna, como en las superficies de *plástico* y en la *gelatina 1.3%* a las 24 horas (**Figura 46C**). Los ganglios se adhirieron muy mal a las superficies de plástico de las placas, siendo necesario pre-tratarlas, al menos, con PLL para conseguir adhesión y emisión neurítica. De este modo, se consideraron únicamente pocillo control los de *plástico + PLL* (**Figura 46A**). Aunque en los ensayos de crecimiento celular basados en MTT los valores más altos correspondieron siempre a estas superficies control, en el estudio de extensión neurítica con GRD las superficies más promotoras de la emisión y elongación fueron las de *quitosano + gelatina*. En este caso, esta superficie se mostró óptima para promover la emisión y elongación neurítica, llegando a tener un área significativamente mayor ($p < 0.01$) a la del resto de superficies en todos los tiempos, siendo esta mezcla la más idónea para promover la emisión y elongación neurítica (**Figura 46B**).



C

Área de Extensión Neurítica



Esto convierte a la mezcla de *quitosano* + *gelatina* en un sustrato ideal para construir puentes que permitan el crecimiento axonal y la adhesión y división de células típicas del sistema nervioso, además de células promotoras de la regeneración, como la GEBO.

4.3.3.4. Elección de una de las superficies para construir puentes

Cuando se desea reparar una lesión medular utilizando puentes contruidos con un material exógeno, estos deben cumplir una serie de requisitos en función de los resultados deseados. Los principales deben ser la biocompatibilidad y biodegradabilidad, para no provocar rechazo inmunitario. En segundo lugar, debe de tener unas propiedades físico-químicas adecuadas para aportar una superficie de crecimiento sobre la cual los axones lesionados puedan crecer y tengan un soporte sobre el que cruzar el tejido medular perdido tras la lesión. Además, el material debe permitir el crecimiento de células propias del sistema nervioso, para poder recuperar la homeostasis interna y debe permitir la neovascularización. Por último, el material debe poder utilizarse junto con otras estrategias reparadoras, como los trasplantes de GEBO, porque las lesiones del sistema nervioso central son muy complejas y su reparación debe ser afrontada con un abordaje múltiple. En este trabajo, por lo tanto, se realizó un estudio completo de las mezclas de quitosano con gelatina y PLL, basado en estudios físico-químicos, estudios de adhesión y proliferación celular y de extensión neurítica en cultivos de GRD, para evaluar cual de las mezclas era idónea para construir puentes para su implante en modelos animales de lesión medular.

Tras el estudio de sus propiedades físico-químicas, se vio que las mezclas de quitosano, tanto con la gelatina como con la PLL, únicamente indujeron ligeros cambios de estructura asociados a interacciones de tipo electrolítico, aunque la mezcla de los tres componentes, *quitosano* + *gelatina* + *PLL* resultó ser la más estable y la de mayor superficie específica (más porosa).

Figura 46: Crecimiento neurítico de ganglios de la raíz dorsal sobre las superficies de quitosano con gelatina y PLL. Las dos superficies de mayor extensión fueron las control de *plástico* + *PLL* tanto a las 24 (A1) como a las 48 horas (B1), aunque fue superada significativamente por las superficies de *quitosano* + *gelatina* tanto a las 25 (A2) como a las 48 (B2) horas. La representación gráfica del área de extensión neurítica se representa en C, donde se observa el efecto claramente promotor de la neuritogénesis de las superficies de *quitosano* + *gelatina*. (Imágenes en contraste de fases donde se ha resaltado el alo neurítico para su mejor visualización. Barras de 300µm).

En principio, estas propiedades físico-químicas sugieren que éste es el sustrato con mejores propiedades para su utilización en reparación nerviosa. Sin embargo, tras los estudios de supervivencia, metabolismo y extensión neurítica, este sustrato resultó ser uno de los menos permisivos para la adhesión y crecimiento celular y no permitió la extensión neurítica en su superficie. Las propiedades físico-químicas que, en principio, parecían más idóneas para el crecimiento celular no fueron las óptimas para su utilización en reparación nerviosa. De las tres mezclas ensayadas, el *quitosano + gelatina* condujo a los resultados óptimos. Aunque fue la mezcla que tuvo menor superficie específica, es decir, la menos porosa, fue la superficie más permisiva para la adhesión neuronal y fue la que mejor promovió el crecimiento y proliferación de células gliales y la extensión de neuritas desde explantes de GRD. Así, teniendo en cuenta que la implantación de un puente en el espacio dejado tras una lesión medular debe ser una vía para el crecimiento de los axones en regeneración, la extensión neurítica de los GRD muestra que este material es el idóneo, tanto para la adhesión neurítica como para su elongación tras distancias. Por otra parte, los estudios de cultivos han mostrado que este sustrato permite la adhesión y supervivencia de células propias del sistema nervioso central (SNC), como los astrocitos, cuya presencia es esencial para restaurar el ambiente homeostático interno tan característico del SNC y formar una nueva barrera hematoencefálica. Otro aspecto relevante de este material es su capacidad de estimular la proliferación de la GEBO, células promotoras de la regeneración y, sorprendentemente, de inducir en ellas una respuesta de crecimiento orientada. Este último aspecto es especialmente importante ya que, en caso de que exista regeneración axonal a través del puente, la orientación de estos axones será un factor esencial para su correcta reconexión de los mismos con sus dianas denervadas.

Por lo tanto, y teniendo en cuenta los objetivos principales del implante tras una lesión medular (adhesión y elongación axonal; crecimiento de células propias del sistema nervioso central, como los astrocitos; sustrato óptimo para el crecimiento e invasión de células promotoras de la regeneración, como la GEBO; etc), se eligió la mezcla de *quitosano + gelatina* como la idónea para construir puentes para su implantación en modelos animales de lesión medular.

4.3.4. Puentes de quitosano + gelatina y estudios *in vivo*

4.3.4.1. Aspectos macroscópicos de las médulas y los implantes

Los experimentos estuvieron caracterizados por una elevada mortalidad de los animales, situada en un 29% de los individuos operados (**Tabla 3**). La mayor mortalidad se registró en el grupo experimental con puente sin células transplantadas, aunque no se observó correlación con este tratamiento como responsable de la muerte de más individuos. La causa principal de la muerte de los animales fue la pérdida de función de la vejiga urinaria. Estos problemas se derivan, por una parte, de la pérdida del control supraespinal de la función vesical como consecuencia de la interrupción de fibras procedentes de la corteza cerebral y del centro pontino de la micción. Por otra parte, de la pérdida de la información sensorial sobre el estado de la vejiga (por ejemplo, información sobre la presión vesical), como consecuencia de la interrupción de fibras sensoriales ascendentes. La consecuencia de todo ello es la aparición de una vejiga hiperrefléxica, que no libera la orina correctamente y que está expuesta, en muchos de los casos, a rupturas por presión excesiva que desencadena la muerte del animal.

Individuos utilizados e incidencias			
Grupo Experimental	Individuo	Supervivencia (en Días Post-Operación)	Causas de la muerte
Controles	1	8 DPO	Rotura de vejiga
	2	60 DPO	Fin de Experimento
	3	60 DPO	Fin de Experimento
	4	60 DPO	Fin de Experimento
	5	60 DPO	Fin de Experimento
Puentes de Quitosano + Gelatina	1	4 DPO	Sangrado Peritoneal
	2	5 DPO	Rotura de vejiga
	3	6 DPO	Rotura de vejiga
	4	60 DPO	Fin de Experimento
	5	60 DPO	Fin de Experimento
	6	60 DPO	Fin de Experimento
Puentes de Quitosano + Gelatina + Transplante de GEBO	1	47 DPO	2ª Cirugía
	2	60 DPO	Fin de Experimento
	3	60 DPO	Fin de Experimento
	4	60 DPO	Fin de Experimento
	5	60 DPO	Fin de Experimento
	6	60 DPO	Fin de Experimento
Total individuos operados:		17	
Total individuos supervivientes:		12	

Tabla 3: Número total de individuos utilizados en cada grupo experimental y número de individuos que llegaron al final del experimento tras 60 días. El número de animales supervivientes al final del experimento en cada grupo fue de: 4 para los controles; 3 para los puentes; y 5 para los puentes + transplante.

Una vez que los animales fueron sacrificados y profundizados, estudiamos el aspecto de cada grupo experimental. Así, en los individuos *control*, se formó una matriz fibrosa, poco compacta y que no mantuvo el diámetro medular en la región lesionada, cuyo originada probablemente por coágulos derivados del sangrado postquirúrgico (**Figura 47**). En los individuos con puentes de *quitosano + gelatina*, se observó un puente de color

similar al del tejido medular, aunque con la región medial adelgazada y transparente, sin mantenimiento del diámetro medular. Por último, en los individuos que recibieron transplantes de células de GEBO, el puente presentó una consistencia mayor, con mantenimiento del diámetro medular y con una perfecta integración en el tejido. Sin embargo, los estudios anatómicos posteriores no mostraron diferencias con respecto a los individuos que no recibieron transplantes, de modo que éstos no mostraron mejoras con respecto a ellos.



Figura 47: Aspecto de las médulas tras su extracción a los dos meses de supervivencia. En los individuos control se formó una matriz de tipo coágulo que mantuvo unidos los dos muñones, mientras que en los individuos con puente se observó mantenimiento del diámetro medular y la formación de una matriz más densa. (Imágenes tomadas con una cámara Nikon Coolpix 4500).

4.3.4.2. Estudios anatómicos

Trazado del tracto corticoespinal con biotina dextranoamina y de las células de glía envolvente de bulbo olfativo transplantadas

El tracto corticoespinal (TCE) de la rata discurre, principalmente, por la región dorsal de la médula, identificándose principalmente en las regiones dorsomedial y dorsolateral. Por esta razón, el trazado del TCE se buscó en las secciones horizontales más dorsales de los animales de este estudio. En todos ellos se detectó marcaje con biotina dextranoamina (BDA) en los axones del TCE, marcando fibras principalmente en la región dorsomedial contralateral al hemisferio donde se inyectó el trazador. Las fibras aparecieron únicamente en el muñón rostral, que tiene continuidad con el cerebro, e inmediatamente anteriores a la barrera de astrocitos reactivos que constituye la cicatriz glial (**Figura 48A**). En ningún caso se observaron fibras que cruzaran esta cicatriz e invadieran el interior de los puentes, indicando que no existió regeneración de estos axones centrales. En muchos de los casos el trazador se acumuló en los extremos más distales de los axones lesionados, en los llamados bulbos de retracción, típicos de axones

en degeneración (**Figura 48B**). Estas observaciones indican que los tratamientos utilizados en este estudio, tanto el puente como los trasplantes con células de GEBO, no promovieron la regeneración de axones centrales del TCE ni, probablemente, de otros tractos supraespinales.

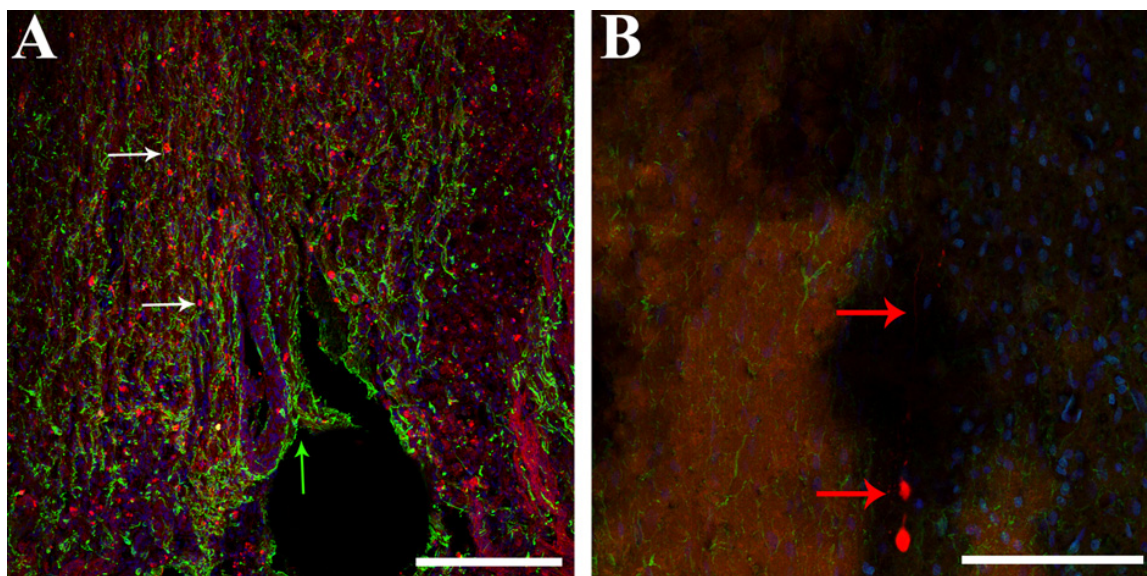


Figura 48: Trazado del tracto corticoespinal mediante biotinadextranoamina. En todos los individuos se observó a los axones del TCE marcados (rojo) hasta la barrera que forma la cicatriz glial (flecha verde) de astrocitos marcados con GFAP (verde), donde se acumuló formando bulbos de retracción (flechas blancas) (A). En la siguiente imagen se muestra un detalle de los bulbos de retracción de los axones del TCE en colapso (B). (Barras de 200µm en A y 100µm en B).

Por otra parte, el marcador celular vital CFDA-SE, con el que se trazaron las células de GEBO transplantadas, se perdió por completo en todos los individuos, bien porque las células habían muerto o bien porque el colorante se había degradado. Por lo tanto, se hizo imposible observar el comportamiento de las células transplantadas en el tejido medular.

Anatomía estudiada mediante inmunohistoquímica

El marcaje nuclear con Hoechst permitió estudiar la invasión celular del interior de los puentes (**Figura 49**). Una primera observación notable fue que en todas las médulas estudiadas se observó una banda de alta densidad celular que rodeando a los muñones medulares en su región exterior. Esta banda estaba probablemente constituida por células procedentes de los muñones medulares lesionados, de la meninge que los recubre o de los vasos sanguíneos dañados. Esta migración de células desde los

muñones fue la que, probablemente, dio lugar a la matriz generada en los controles, que ocupó el espacio generado entre los muñones y los puentes implantados en de la cirugía. Posteriormente mostraremos como es en esta región donde se detecta una mayor cantidad de células promotoras del crecimiento axonal, como las células de Schwann, además de ser la región donde se observó mayor crecimiento neurítico. Por ello, esta región particular, que apareció en todos los individuos, independientemente del grupo experimental, se llamará *región de alta densidad celular*.

En estas mismas secciones fue identificada la cicatriz glial mediante inmunomarcaje de los *astrocitos reactivos hipertróficos* con GFAP monoclonal. Este anticuerpo mostró la barrera que forman estas células, aislando el SNC después de una lesión, formando una banda intensamente marcada para GFAP (**Figura 49, color rojo**) en torno a los muñones medulares lesionados, a través de la cual no pudieron cruzar los axones centrales regenerativos. Este marcador reveló la ausencia de marcaje en el exterior del tejido del sistema nervioso central, indicando que los astrocitos ni invadieron los puentes ni salieron del tejido medular lesionado. Las neuritas de los diferentes tipos celulares, marcadas con el anticuerpo anti-Neurofilamentos, muestran la existencia de numerosas fibras en la *región de alta densidad celular* en la región externa de los muñones medulares (**Figura 49, color verde**). También se observó marcaje de fibras neuríticas en el interior de los puentes, procediendo según su trayectoria de las raíces dorsales vecinas. Estas fibras se localizaron en toda la extensión de la matriz extracelular formada en los individuos control (**Figura 49 CTR y A**), disponiéndose de manera irregular y desorganizada. En los individuos con puentes, tanto con trasplantes celulares como sin ellos, únicamente se observaron fibras en una pequeña región de células y matriz extracelular en el exterior de los puentes, siendo su presencia prácticamente indetectable en el interior de los mismos (**Figura 49 Puente Q+G y B; Puente Q+G y Transplante, y C**). Se comprobó que muchos de los puentes implantados se fragmentaron, presentando un aspecto esponjoso con multitud de fisuras a través de las cuales se introdujeron células. Estas regiones con células del interior de los puentes no promovieron el crecimiento de neuritas por su interior, exceptuando alguna fibra aislada en aquellas regiones donde el puente se encontraba menos fragmentado.

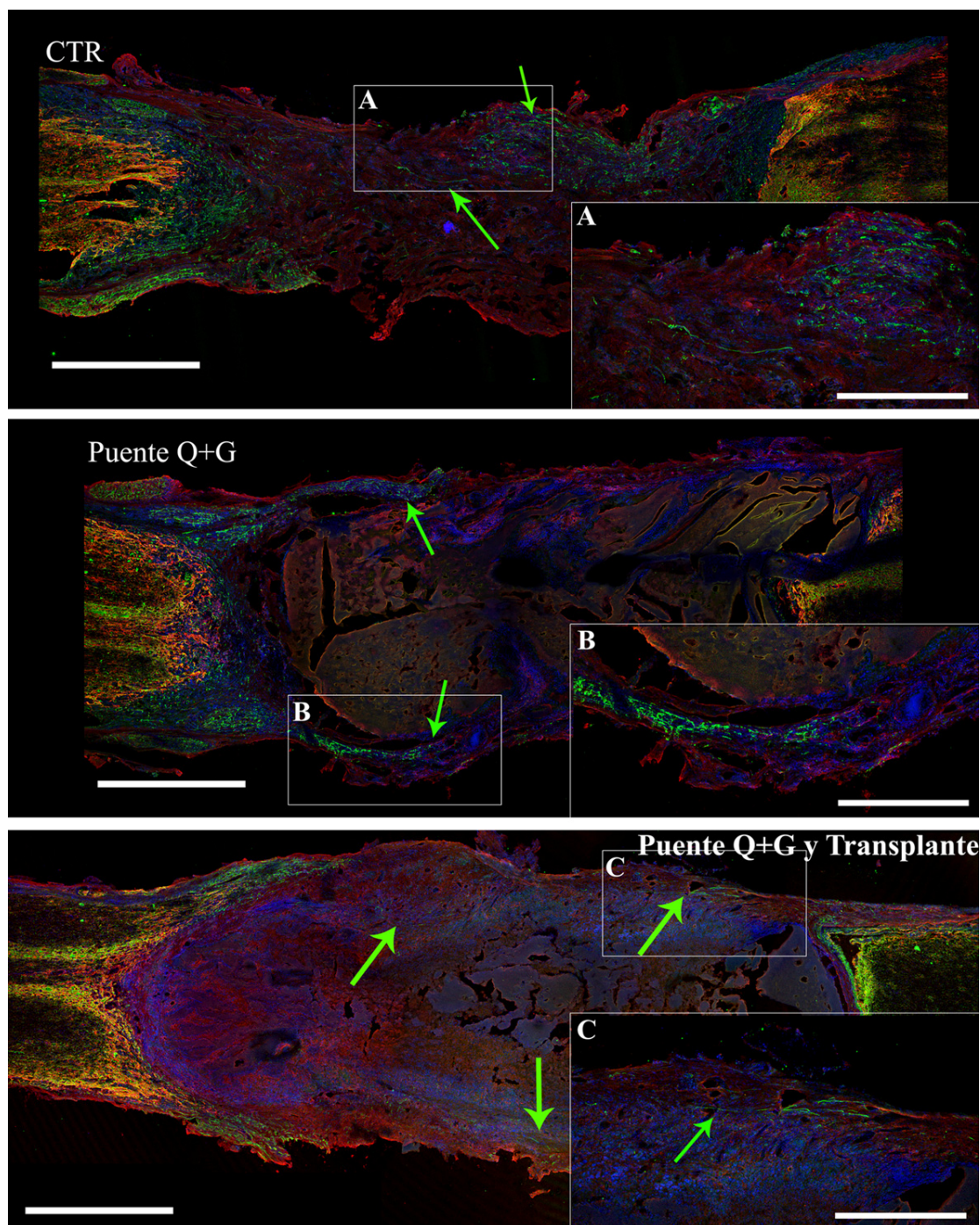


Figura 49: Marcaje de neuritas con Neurofilamento (verde), astrocytos con GFAP (rojo) y núcleos con Hoechst (azul) en los tres grupos experimentales. Se observa el marcaje de los astrocytos de la cicatriz glial en los tres grupos, formando una barrera a través de la cual no lograron pasar los axones centrales. Sin embargo, el marcaje neurítico mostró la invasión de neuritas desde las raíces dorsales vecinas penetrando en la matriz control (A) e invadiendo únicamente la matriz fibroso-celular que rodeó a los puentes de los individuos implantados (B y C). En todos los casos hubo invasión celular, quedando restringida, en los individuos implantados, a una banda de matriz extracelular que rodeó los puentes, y en algunas ocasiones por el interior de fisuras generadas en los mismos. (Muñón caudal a la izquierda y rostral a la derecha. Barras de 1mm para las imágenes grandes; barras de 50μm para A, B y C).

Teniendo en cuenta la trayectoria de las neuritas que habían invadido los puentes, examinamos, mediante otros marcadores, si las fibras que penetraron en los puentes procedían de fibras sensoriales, colaterales de las raíces dorsales vecinas emitidas en la zona de lesión. Como la trayectoria de las neuritas apuntó claramente a su procedencia de raíces dorsales vecinas (**Figura 49**), procedimos a marcar los tipos de fibras sensoriales más abundantes en los ganglios y raíces dorsales periféricas, mediante un anticuerpo contra el péptido relacionado con el gen de la calcitonina o CGRP. Este marcador, que lo expresan abundantemente pequeñas fibras nociceptivas amielínicas procedentes de los ganglios de la raíz dorsal (Hildebrand et al., 1997), ha sido descrito en numerosas colaterales en la médula tras una lesión, llegando a verse fibras procedentes de hasta 5 segmentos medulares más allá del segmento lesionado (Traub et al., 1989; Belyantseva and Lewin, 1999), por lo que las fibras CGRP positivas detectadas en la zona de lesión, que proyecten desde raíces dorsales vecinas, proceden con seguridad de estos colaterales. En los tres grupos experimentales se observó marcaje de estas fibras en las raíces dorsales vecinas al segmento medular lesionado, desde donde los terminales fibrosos siguieron trayectorias por el exterior de los muñones medulares hasta invadir las regiones más proximales, principalmente la *región de alta densidad celular*, e incluso penetraron ligeramente los puentes por la matriz generada en torno a los mismos (**Figura 50A, B, C y D, flechas verdes**). Conjuntamente con este marcador, teniendo en cuenta que la emisión de colaterales por estas fibras es un proceso de nueva neuritogénesis, examinamos la inmunorreacción con un anticuerpo contra la proteína del citoesqueleto Neurofilamento 200 (NF200), cuya expresión aparece principalmente en fibras en proceso de crecimiento y elongación, indicando que son fibras de nueva generación. El marcaje para NF200 mostró tinción de fibras principalmente por la *región de alta densidad celular* (**Figura 50**, región que aparece entre las líneas punteadas amarilla y azul), algunas de las cuales expresaron también el péptido CGRP (**Figura 50E, F y G**). Muchas fibras que no expresaron el péptido CGRP son, probablemente, colaterales de otro tipo de fibras sensoriales procedentes de las raíces vecinas, porque presentan un crecimiento difuso y desorganizado. Observamos algunas fibras invadiendo los puentes desde la matriz que los rodeaba (tanto en animales transplantados como los que no recibieron transplantes), expresando uno solo o ambos marcadores a la vez, aunque las pocas fibras detectadas fueron predominantemente fibras peptidérgicas CGRP positivas (**Figura 50E, F, G, H, I, J y K**).

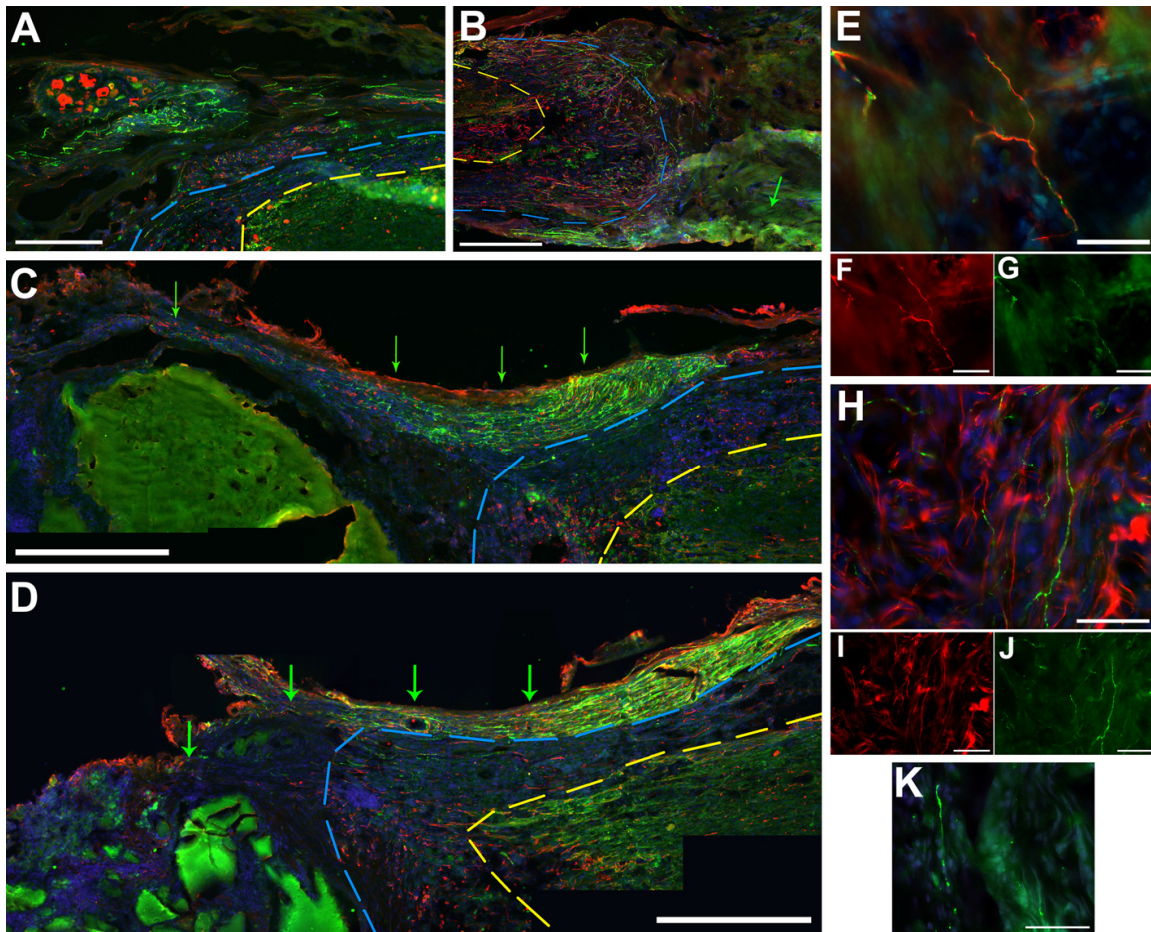


Figura 50: Marcaje de fibras peptidérgicas CGRP (verde), fibras en crecimiento con NF200 (rojo) y núcleos con Hoechst (azul). En los tres grupos experimentales se observaron fibras CGRP invadir la *región de alta densidad celular (radc)*, mostrada entre las líneas punteadas amarilla (que marca el fin del muñón medular), y la azul (que marca el comienzo del puente), y algunas regiones de los puentes. Su procedencia es a partir de colaterales de axones de las raíces dorsales vecinas. En individuos control se observó la invasión de fibras CGRP-positivas desde una raíz dorsal hacia la zona del puente (A), llegando a ocupar la *radc*. En este caso estas fibras se vieron acompañadas de otras positivas para NF200 (B). En muchos de los casos, estas fibras expresaron simultáneamente ambos marcadores (E, F y G). En los individuos con implante se comprobó el mismo patrón de las fibras CGRP y NF200 que invadían la *región fibroso-celular* a partir de colaterales de las raíces dorsales vecinas (C). En algunos individuos se observó la invasión de fibras NF200-positivas que podrían corresponderse con fibras propioceptivas en crecimiento procedentes de las raíces vecinas, las cuales invadían la *radc*. En algunas ocasiones estas fibras expresaron conjuntamente el péptido CGRP (H, I, J y K). Por último se comprobó este mismo patrón en los individuos con transplante (D), donde las neuritas invadieron los puentes desde raíces vecinas. (Barras de 500µm para B, C y D; de 300µm para A; de 50µm para E, F, G, H, I, J y K).

La expresión de este péptido ha sido descrita en los somas de las neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal y en las motoneuronas de las astas ventrales de la médula espinal, además de en las raíces dorsales y la médula espinal (Gibson et al., 1984). También se ha observado su sobreexpresión tras daño periférico, indicando una respuesta de los cuerpos neuronales a la lesión (Zheng et al., 2008). En nuestro estudio,

en el que la lesión producida no fue periférica sino central, también se observó una expresión acentuada de este péptido en todos los grupos experimentales, tanto en los somas de los GRD como en las motoneuronas de los muñones rostral y caudal a la lesión (**Figura 51**). Este marcador, utilizado conjuntamente con el NF200, mostró también la expresión de esta proteína del citoesqueleto en algunos de los cuerpos neuronales de los GRD, aunque raras veces colocalizaba con el péptido CGRP (**Figura 51A, B y C**). Detectamos también su presencia en algunos de los somas de las motoneuronas espinales (**Figura 51D, E y F**). La presencia de este marcador en estas células se explica como una respuesta de los cuerpos neuronales a la lesión, sobreexpresando proteínas del citoesqueleto asociadas al crecimiento.

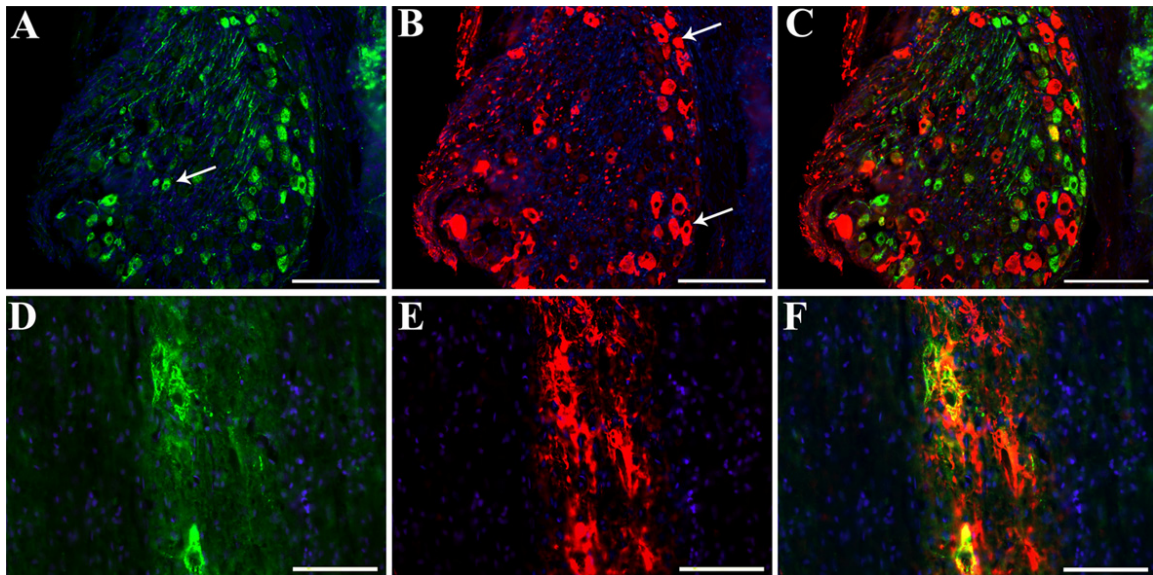
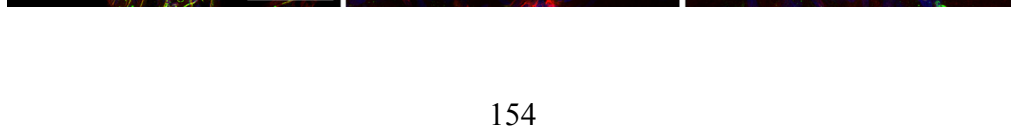


Figura 51: Expresión de CGRP (verde) y NF200 (rojo) en los somas de las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal y en motoneuronas espinales. En todos los individuos en los que se cortó un ganglio se detectó marcaje somático para el péptido CGRP, señalando a las neuronas nociceptivas peptidérgicas (A y C). Por otra parte, muchos de los somas que no expresaron el péptido CGRP sí expresaron la proteína NF200 (B y C), mientras que un número bajo de ellas expresó los dos marcadores (C). Este comportamiento también fue observado en motoneuronas espinales, que expresaron el péptido CGRP (A y C) o la proteína NF200 (B y C), aunque en este caso la mayoría de las células expresaron los dos marcadores (C). (Barras de 200µm para A, B y C; barra de 100µm para D, E y F).

Una vez identificados el tipo de fibras que habían crecido en la zona de lesión y su procedencia, intentamos identificar el tipo o tipos celulares que estaban presentes en los puentes, tanto aquellas que son promotoras de la regeneración, como las células de Schwann (CS), como las asociadas a una respuesta inflamatoria, como son los macrófagos y los linfocitos T. En primer lugar, y teniendo en cuenta sus propiedades

promotoras del crecimiento y regeneración, se estudio la presencia de CS en los puentes. La expresión del receptor p75 en las CS aumenta tras una lesión (Taniuchi et al., 1986; Johnson, Jr. et al., 1988; Gai et al., 1996), ayudando al crecimiento y regeneración axonal envolviendo paquetes neuríticos. Tras los tratamientos aplicados en los distintos grupos experimentales, el marcaje para p75 se observó en células con morfología fusiforme y un comportamiento típico de las CS promotoras de la regeneración tras una lesión. En los *controles* se observaron muchas células p75-positivas en el interior de los puentes, dispuestas de forma dispersa y desorganizada. En algunas regiones de la matriz extracelular de estos individuos localizamos algunas células p75-positivas asociadas íntimamente con fibras aisladas (**Figura 52A, B y C**), a las que envolvían completamente (**Figura 52D, E y F**). Este comportamiento se observó en todos los grupos experimentales en las regiones en que se localizaron células p75-positivas asociadas a una sola fibra. Sin embargo, en la mayor parte de los individuos control el marcaje de células con anti-p75 reveló una localización mayoritaria en la *región de alta densidad celular* (**Figura 52G**) y, más discretamente, en la matriz generada a modo de puente (**Figura 52H e I**). Allí, estas células aparecieron asociadas a paquetes neuríticos, a los que envolvían como lo hacen las CS con fenotipo no mielinizante con paquetes axonales en nervios periféricos. En los individuos que recibieron puentes de *quitosano + gelatina*, independientemente de si habían recibido o no transplantes de células de GEBO, la presencia y localización de estas células fue similar, concentrándose en la *región de alta densidad celular* (**Figura 52D, L, N y O**) así como en la matriz fibroso-celular que rodeó a los puentes (**Figura 52J y M**). En estos casos las células p75-positivas se asociaron a una sola fibra en sentido longitudinal (**Figura 52, flechas blancas**) o bien envolvieron paquetes neuríticos como los observados en los controles (**Figura 52K, flecha amarilla**).



Para identificar las CS no mielinizantes, finalmente realizamos un marcaje doble para el receptor p75 y la proteína GFAP (Jessen et al., 1984; Jessen et al., 1990). Para la identificación de la proteína GFAP, se utilizó el anticuerpo policlonal anti-GFAP, que se une a más epítomos de la proteína GFAP que a los estrictamente centrales (Jessen and Mirsky, 1985). Este marcador permitió ver como muchas de las células que expresaban el p75, tanto las que estaban en los puentes como las que los rodeaban, expresaban también la proteína GFAP, permitiendo identificarlas como CS de fenotipo no mielinizante. La inmensa mayoría de estas células presentaron, además, una morfología fusiforme (**Figura 53A, B y C**). En algunas regiones, como la matriz que rodeó a los puentes, se identificaron gran cantidad de células fusiformes que expresaron los dos marcadores, aunque también hubo células positivas únicamente para el receptor p75 o para la proteína GFAP (**Figura 53D, E y F**), probablemente dos subpoblaciones de CS. Nuevamente, la mayor cantidad de estas células se localizó en la *región de alta densidad celular*, donde la mayoría de ellas presentaron una morfología fusiforme o tubular típica de las CS no mielinizantes (**Figura 53G, H e I**). En este caso observamos como las células p75-GFAP no penetraron en el interior de los puentes, permaneciendo en la región entre el puente y la médula, donde también observamos grupos de células p75-positivas que no expresaron la proteína GFAP (**Figura 53H e I**).

Figura 52: Marcaje de células de Schwann con p75 (rojo), de fibras neuríticas con Neurofilamento (verde) y de núcleos con Hoechst (azul). En la matriz control se detectaron gran cantidad de CS estrechamente asociadas a fibras neuríticas (A, B y C), llegando en multitud de ocasiones a envolver a las mismas a razón de una CS por cada fibra (D, E y F). La presencia de células fue muy alta en la *región de alta densidad celular (radc)*, donde se observaron CS asociadas, en unos casos, a una sola fibra longitudinalmente (G) mientras que en otros, rodearon a pequeños paquetes neuríticos (H e I). En los individuos con implantes únicamente se vieron estas células en la *matriz fibroso-celular* que rodeó a los puentes (J) aunque el mayor número de células se encontró en la *radc* (K y L). Este comportamiento fue similar al visto en los individuos con transplante, donde gran cantidad de neuritas aparecieron envueltas por CS (M, N y O). (Barras de 200µm para H; 100µm para G, J, K, L y M; 50µm para A, B, C, I y N; 30µm para O; 20µm para D; 18µm para E; 5µm para F).

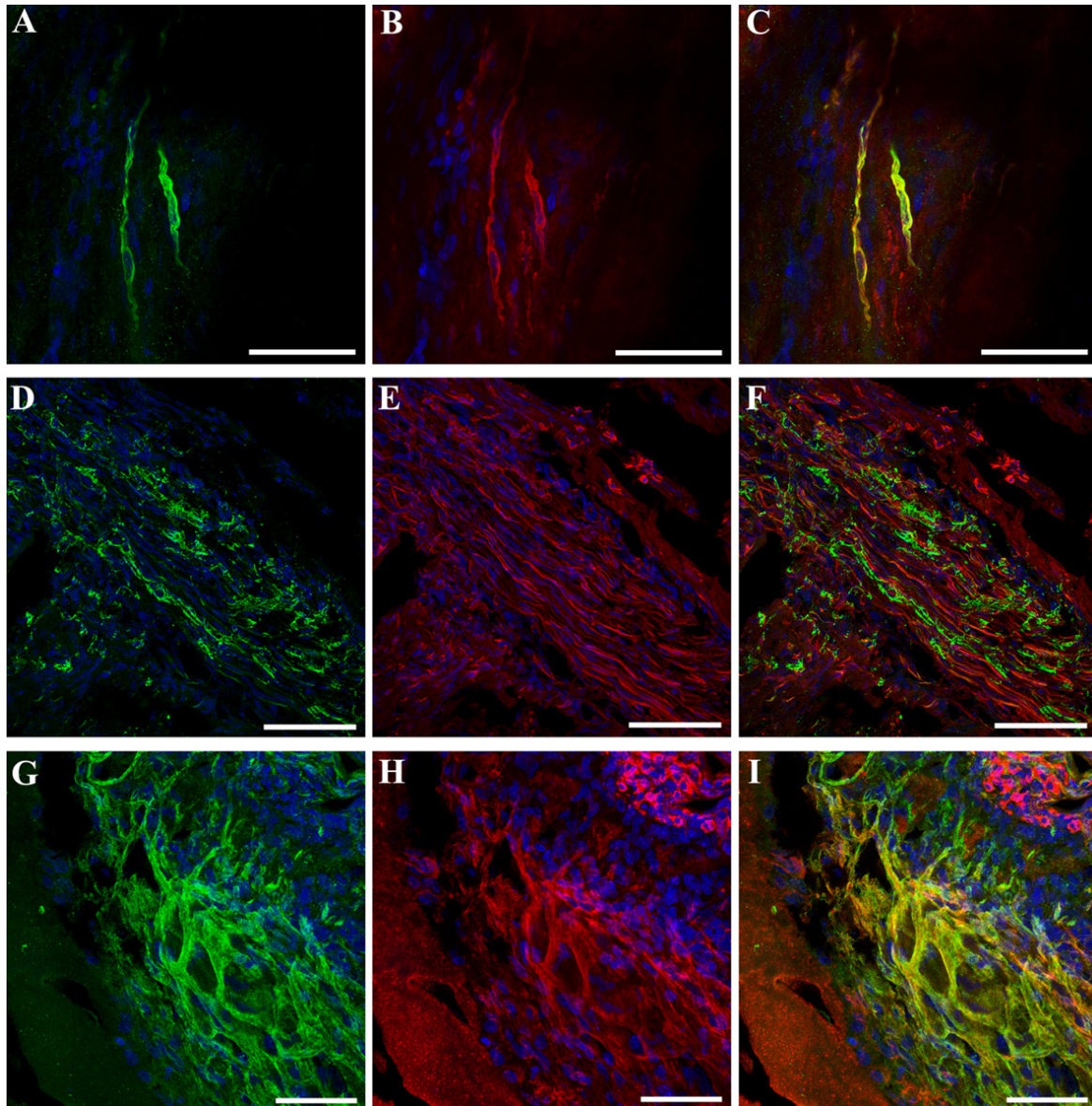


Figura 53: Marcaje para la proteína GFAP (verde), para el receptor p75 (rojo) y nuclear con Hoechst (azul). Las células fusiformes p75-positivas se identificaron como células de Schwann (CS), ya que muchas de ellas estaban estrechamente asociadas a fibras neuríticas y, a su vez, marcaban para el anticuerpo policlonal anti-GFAP, típico de glía periférica. Se muestran imágenes representativas de algunas CS encontradas en los controles con morfología fusiforme (A, B y C); también se encontraron estas células en la *región de alta densidad celular* de los individuos con puentes, donde se observó gran abundancia de las mismas (D, E y F). Misma región en los individuos transplantados en G, H e I. (Barras de 100µm para D, E y F; barras de 50µm para A, B, C, G, H e I).

Para identificar una posible respuesta inflamatoria al implante, buscamos la presencia de células inmunes en los puentes, indicativas de una reacción de rechazo a los mismos. La inmunotinción para el receptor de linfocitos T activados ($TCR\alpha/\beta$) mostró la presencia de estas células en los tres grupos experimentales, aunque de

manera muy difusa y heterogénea. En la matriz control se observaron linfocitos escasos y dispersos a lo largo de toda la matriz (**Figura 54A**). Sin embargo, en los individuos con puentes implantados se observaron densos acúmulos de estas células entre las fisuras de los puentes, indicando que hubo una respuesta inflamatoria aguda en algunas regiones de los mismos (**Figura 54B y C**). Sin embargo, no se vieron estas células dentro de los poros de los materiales constituyentes de los puentes.

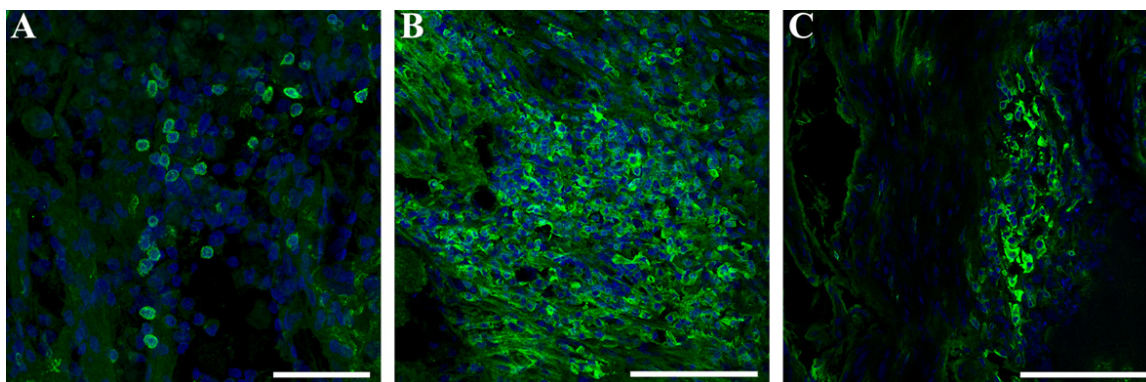


Figura 54: Marcaje para el receptor de células T α / β (verde) y nuclear con Hoechst (azul). Regiones representativas de la matriz a modo de puente de los individuos control (A), o con puente (B) y puente + transplante (C), donde se observaron acúmulos de estas células en algunas de las fisuras de los puentes tras su fragmentación por los movimientos de los animales. (Barras de 100 μ m para B y C; 50 μ m para A).

Los inmunomarcajes para la proteína de membrana lisosomal CD68 y el proteoglicano NG2 identificaron células con actividad fagocítica (CD68-positivas), astrocitos tipo II y progenitores de oligodendrocitos (NG2-positivas). Las células fagocíticas se detectaron en la matriz formada en la región externa que rodeó a los muñones medulares (*región de alta densidad celular*), además de las regiones más proximales a la cicatriz glial en el interior del tejido medular (**Figura 55**). En todas las regiones en que se encontraron células fagocíticas se identificaron células NG2-positivas. Estas células formaron parte, en unos casos, de la cicatriz glial de todos los individuos, identificando su expresión en la membrana de los astrocitos reactivos (**Figura 55B y C**), mientras que en otros casos se vio marcaje fuera del tejido medular, identificándose grupos de células con morfología fusiforme y alargada. Aunque las células tipo macrófago expresan el proteoglicano NG2 (Bu et al., 2001), en este caso, y ya que no expresaban conjuntamente el marcador CD68 típico de macrófagos, se identificaron como otro tipo celular, probablemente como células precursoras gliales (Zai and Wrathall, 2005) o CS que expresan NG2 (McTigue et al., 2001) (**Figura 55G, H e I**).

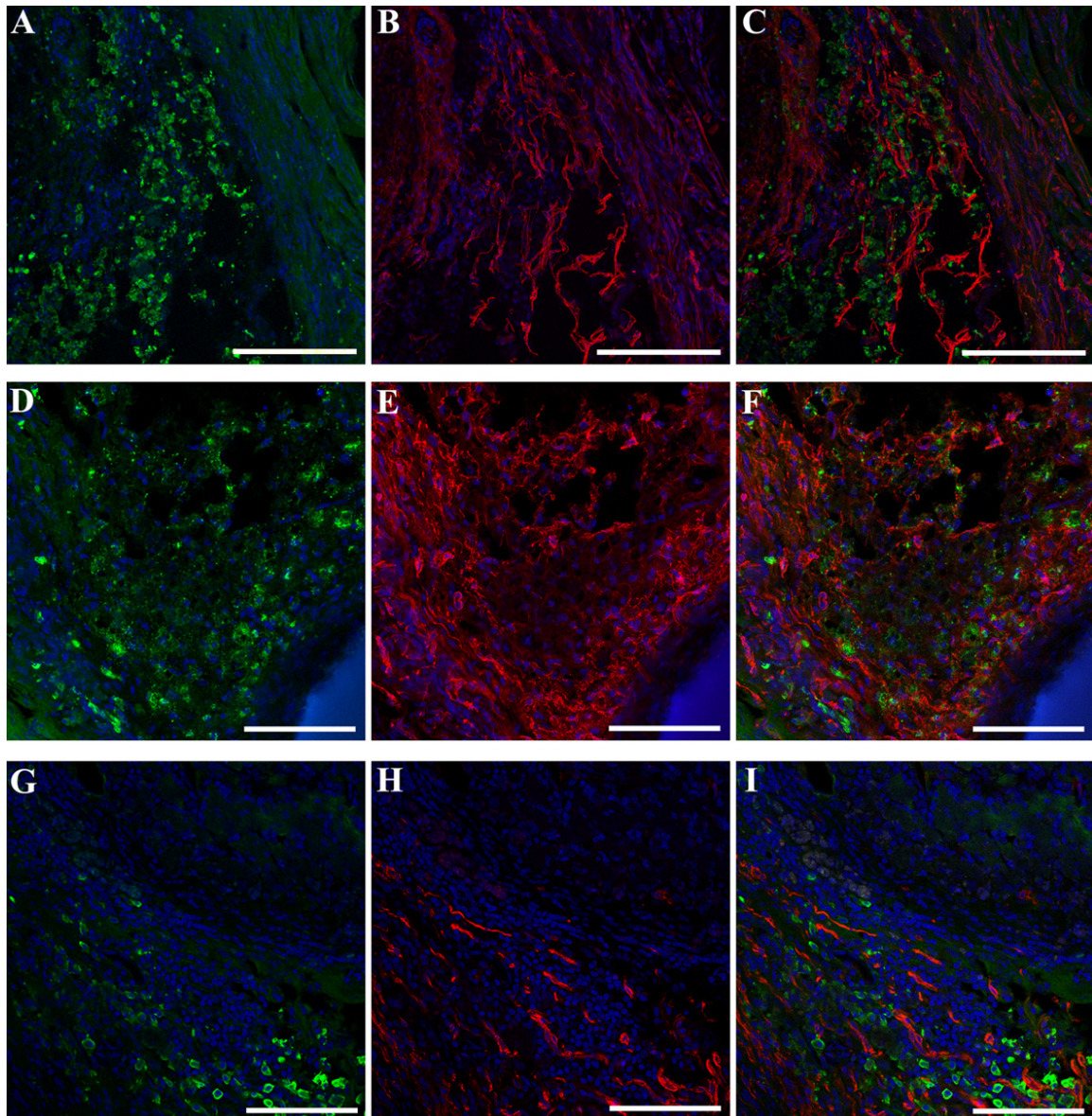
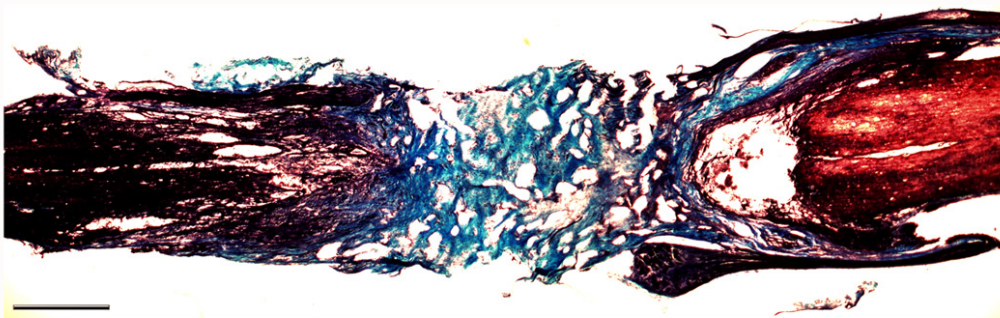


Figura 55: Marcaje para la proteína CD68 (verde), para el proteoglicano NG2 (rojo) y nuclear con Hoechst (azul). Se muestran imágenes de la *región de alta densidad celular* de individuos control (A, B y C), con puente (D, E y F) o puente + transplante (G, H e I), donde se observa el marcaje para CD68, asociado a macrófagos, en las regiones más proximales a los muñones medulares, mostrando las regiones de mayor actividad fagocítica. El anticuerpo para NG2 se unió a los astrocitos reactivos de la cicatriz glial y a un grupo de células fusiformes del exterior del tejido, asociado a CS o a precursores gliales. (Barras de 200µm para A, B y C; 100µm para D, E, F, G, H e I).

Anatomía estudiada con tinción tricrómica de Mallory con azul de anilina

Este marcaje histológico mostró el aspecto general de las médulas y los puentes, además de la presencia de células en el interior de los mismos y las moléculas de matriz extracelular existentes, principalmente colágeno.

CTR



Puente Q+G

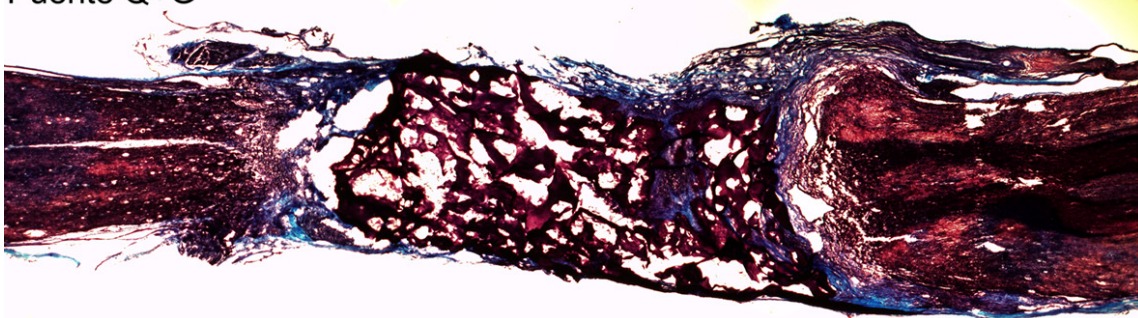
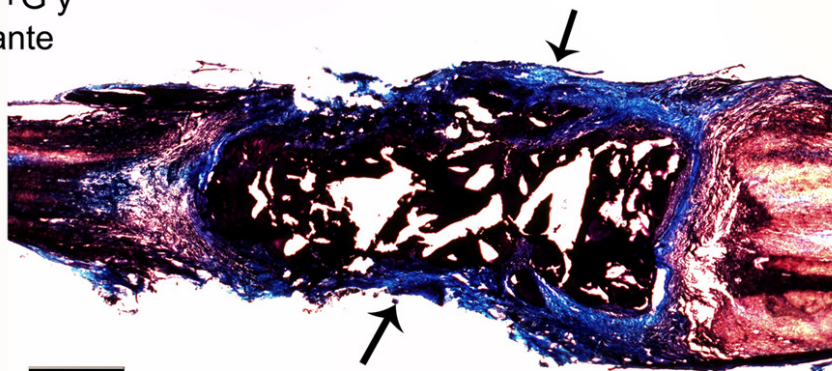
Puente Q+G y
Transplante

Figura 56: Tinción histológica con Tricrómico de Mallory con azul de anilina. Se observa la matriz formada en los controles (CTR), constituida principalmente de células y fibras de matriz extracelular de colágeno (azul). Se observó la formación de cavidades quísticas en el tejido medular y a lo largo de toda la matriz generada en los individuos control. En los individuos con implante, se observó la presencia del puente sin degradar y el alto grado de fragmentación que experimentaron muchos de ellos. En estos casos no se observaron las cavidades quísticas en el tejido medular. También se observó la deposición de matriz extracelular en torno a los puentes (banda azul, flechas negras). (Barras de 1mm).

En las médulas *control* se observó matriz fibroso-celular, generando un puente natural entre los muñones medulares lesionados (**Figura 56CTR**). Se observó la presencia de grandes quistes en el tejido medular, típicos del proceso de degeneración secundaria que ocurre tras una lesión medular, así como la presencia en la matriz generada entre muñones de un fuerte marcaje de fibras basófilas (**Figura 56, fibras azules**), indicativo de la presencia de fibras de colágeno, con muchas cavitaciones que confieren a la estructura un aspecto esponjoso. En algunos de los individuos control se detectó la presencia de otro tipo de fibras más compactas de tipo acidófilo y aspecto estrellado, probablemente depósitos de fibrina, acorde con la estructura de tipo coágulo de esta matriz (**Figura 57A, color rojo**). Un estudio más detallado de la matriz control reveló la presencia, en el interior de algunas regiones de vasos sanguíneos, indicativos de neovascularización (**Figura 57B**). Los puentes de *quitosano + gelatina* implantados, tanto en el grupo experimental transplantado como el que no recibió transplantes, permanecieron intactos, es decir, no experimentaron degradación de su material ni sustitución del mismo por tejido del animal, indicando que la mezcla de *quitosano + gelatina* presentó una gran resistencia a la degradación. Por otra parte, todos los puentes aparecieron fragmentados y con fisuras, generadas probablemente por el movimiento de los individuos (**Figura 56 Puente Q+G y Puente Q+G con Transplante**), indicando que el puente fue perdiendo consistencia y rigidez. Como se indicó al describir la inmunotinción, en todos estos individuos se observó la matriz fibroso-celular que rodeaba a los puentes por su región exterior (banda azul), desde la cual se produjo invasión celular por las fisuras de los puentes (**Figura 57C, D, E y F**). Las células que invadieron los puentes estuvieron acompañadas de matriz extracelular, principalmente fibras de colágeno (**Figura 57, marcaje azul**). En todos los individuos que recibieron puentes se detectó la presencia de quistes en el tejido medular, aunque en todos ellos el tamaño fue menor al observado en los individuos control, indicando que la presencia del puente evitó la formación de grandes quistes en el tejido medular.

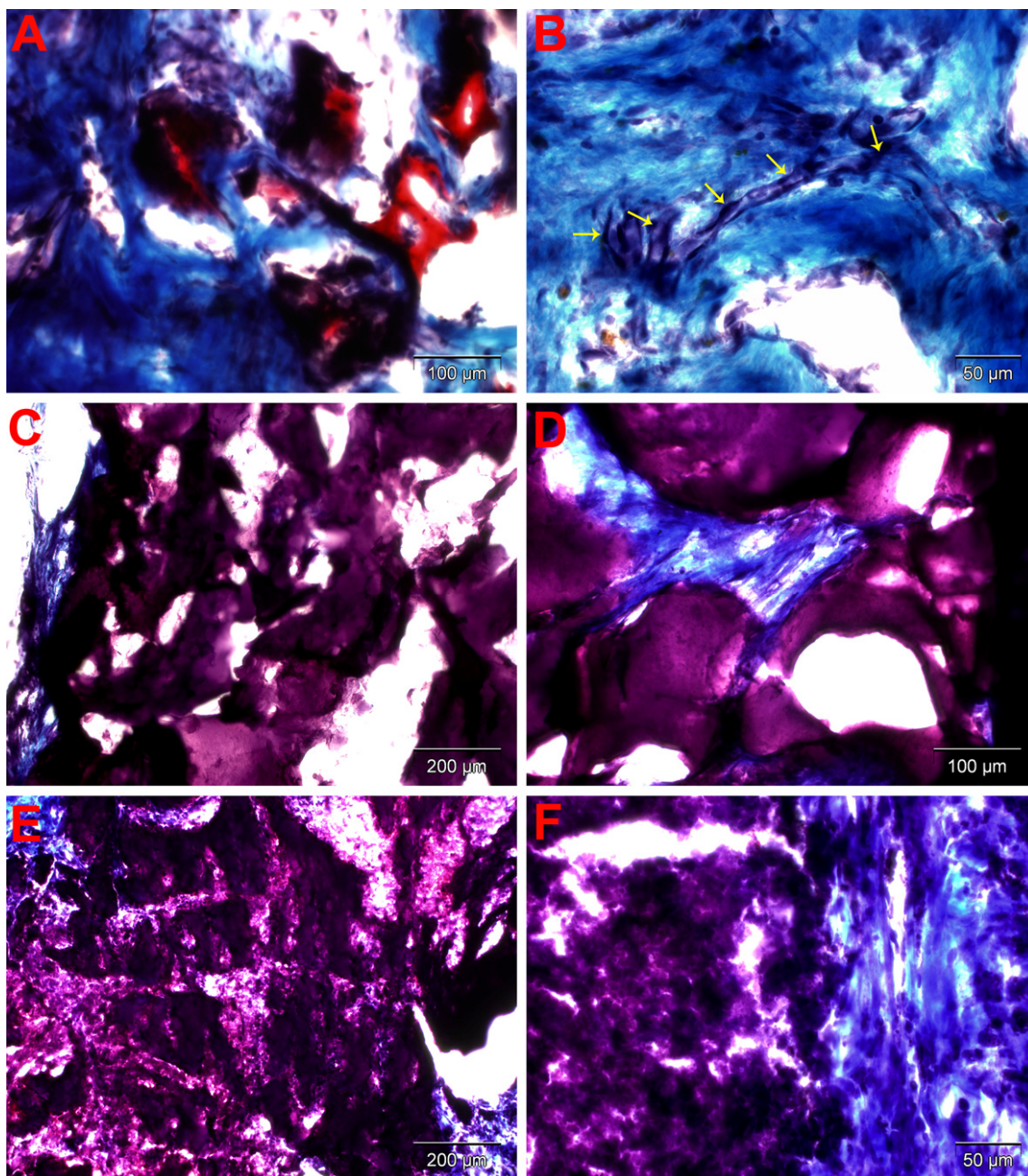


Figura 57: Detalles del interior de los puentes teñidos con Tricrómico de Mallory con azul de anilina. Se observa la gran cantidad de células (puntos oscuros) y matriz extracelular, principalmente colágeno (azul), en los individuos control (A y B). En algunos individuos se observaron acúmulos de fibrina (rojo), probablemente como consecuencia de un sangrado postquirúrgico y la presencia de vasos sanguíneos que apuntan a procesos de neovascularización (B). En los individuos con puentes (C y D) se observó la invasión de un gran número de células y matriz extracelular por las fisuras de los puentes, que definen los lugares que fueron invadidos por fibras y células de Schwann. En los individuos con transplantes (E y F) se observó el mismo patrón que los que no recibieron transplante. Se observa la presencia de células y moléculas de matriz extracelular en la matriz fibroso-celular que rodeó a los puentes (F). (Barras de 200μm para C y E; 100μm para A y D; 50μm para B y F).

4.3.4.3. Estudio funcional de evaluación locomotora en campo abierto mediante la escala BBB

Como describimos en los estudios anatómicos, la presencia de fibras neuríticas en los puentes fue muy escasa y las fibras no correspondieron a axones centrales del TCE ni, probablemente, a ningún otro tracto axonal supraespinal, que no logró superar la barrera de la cicatriz glial. Estas observaciones se reflejaron en la evaluación locomotora en campo abierto (test BBB) como ausencia de movimientos funcionales voluntarios de los miembros inferiores, detectándose únicamente algunos movimientos reflejos en las articulaciones asociadas a descargas reflejas que desencadenan espasticidad (**Figura 58**).

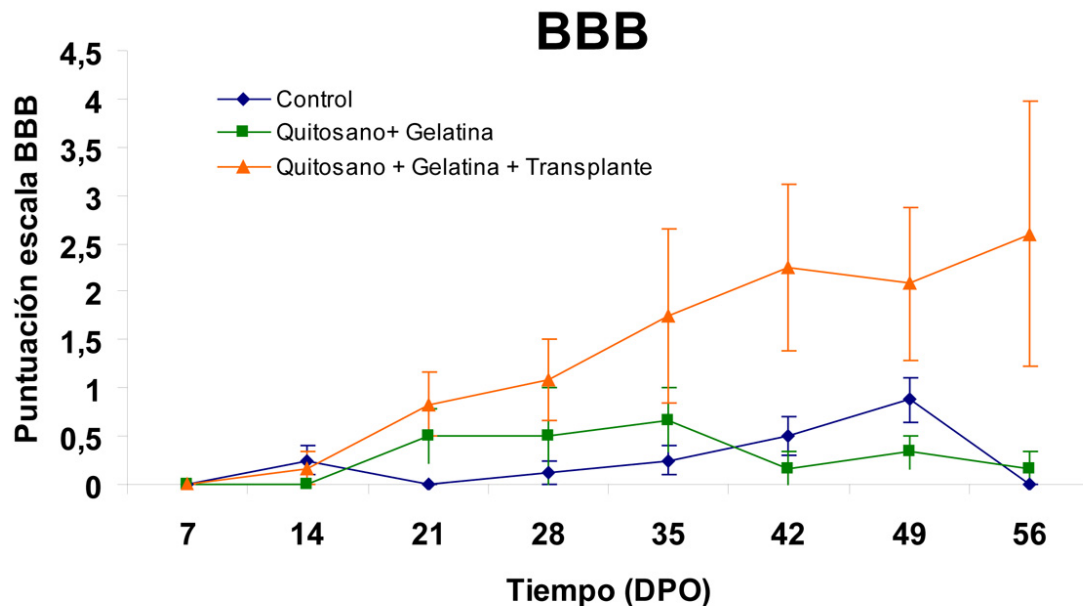


Figura 58: Puntuación obtenida en la escala de evaluación locomotora BBB. Los individuos control (línea azul) y los individuos con puente (línea verde) presentaron aproximadamente la misma puntuación a lo largo de todo el período de estudio, no superando la puntuación de 2 en ningún momento. El grupo de puente + transplante (línea naranja) presentó mayor motilidad pero que no pasó de la puntuación de 5. En todos los casos, los movimientos observados se asociaron a movimientos espásticos de los miembros inferiores (Representación de la media \pm error estándar de $n=4$ para los controles; $n=3$ para los puentes; $n=5$ para los puente + transplante).

Aunque no se observaron diferencias significativas entre los grupos en los distintos tiempos, se observaron diferencias significativas ($F(2,78)= 9,685$; $p<0.01$) entre el grupo que recibió transplantes de células de GEBO y el resto de grupos en el análisis global de los datos (**Figura 59**). Estos datos son consecuencia de que en este grupo se detectó una

mayor movilidad en las articulaciones de los miembros inferiores, en ningún caso asociada a recuperación de la movilidad voluntaria de los mismos, sino a un mayor aumento de los movimientos espásticos derivados de descargas reflejas. La causa de este aumento en los reflejos se asoció al transplante de las células de GEBO en los muñones medulares, probablemente porque su presencia en la zona actuó sobre las interneuronas inhibitorias que regulan las descargas reflejas de las motoneuronas espinales, de modo que éstas se ven sobreactivadas

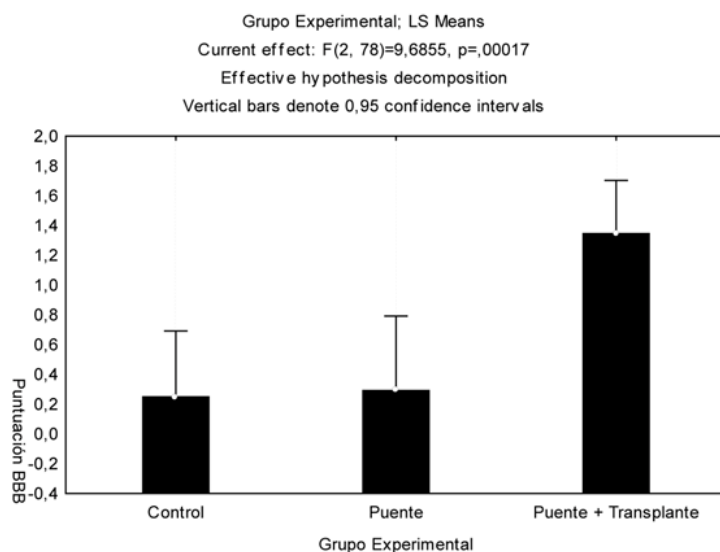


Figura 59: ANOVA de la puntuación BBB entre los grupos experimentales control, puente y puente + transplante. Aunque no se observaron diferencias entre cada uno de los grupos y días entre sí, sí se registró un efecto significativo propio del grupo transplantado, que presentó mayor motilidad de los miembros inferiores.

5.DISCUSIÓN

En este trabajo hemos utilizado quitosano como esqueleto fundamental para construir estructuras destinadas a su implante para la reparación nerviosa, presentando este material excelentes propiedades para la reparación de lesiones medulares (Zahir et al., 2008). Las modificaciones ensayadas a partir de su mezcla con gelatina y poli-L-lisina (PLL) buscaron mejorar y adaptar el quitosano al máximo en su uso para este fin.

5.1. Estudios *in vitro* con geles de quitosano al 2% vs quitosano al 1%

La mayoría de los estudios de adhesión celular realizados *in vitro* hasta la fecha, se han llevado a cabo a partir de soluciones de quitosano al 1% (Haipeng et al., 2000; Cheng et al., 2003b; Mingyu et al., 2004), donde se propone a éste y sus mezclas con otros compuestos como buenos candidatos para su uso en reparación nerviosa. Sin embargo, la consistencia de estos geles es insuficiente para el diseño de estructuras tridimensionales aptas para la construcción de puentes destinados al implante, habiéndose propuesto las concentraciones al 2% como las óptimas para fabricar tubos a modo de puente (Freier et al., 2005; Ciardelli and Chiono, 2006; Wang et al., 2007). Sin embargo, no existe evidencia de que la concentración adecuada para una consistencia adecuada de los puentes (2%) tenga las mismas propiedades beneficiosas *in vitro* que las descritas para una concentración al 1%. En este trabajo hemos comprobado que los geles de quitosano al 2%, además de presentar una rigidez adecuada para poder construir puentes, presentan una superficie celular más pro-adhesiva.

En primer lugar evaluamos la rigidez y consistencia de los geles preparados a partir de ambas soluciones. Estos geles, contruidos mediante la precipitación en medio alcalino, mostraron que la estructura de los geles al 1% presentaban una consistencia sustancialmente inferior a la de los geles al 2%, confiriéndoles una estructura inmanejable para la construcción de puentes. Sin embargo, el aumento de la consistencia no tuvo su reflejo en la morfología de los geles estudiada por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM), algo que ya se había observado para geles de quitosano contruidos por el método de congelación-secado (Madihally and Matthew, 1999). Basado en estas observaciones, postulamos que las diferencias observadas en cuanto a su rigidez eran debidas a variaciones en el tipo e intensidad de las interacciones entre las cadenas sacarídicas del polímero. Estas interacciones deberían ser consecuencia de la naturaleza policationica del quitosano que hacen de la molécula una estructura muy susceptible de establecer interacciones de tipo iónico entre sus cadenas. La estructura

catiónica es consecuencia de los numerosos grupos amino libres en sus monosacáridos, responsables, a su vez, de la solubilidad del quitosano en medio acuoso cuando se encuentran en protonados a pH ácido (Madihally and Matthew, 1999). A medida que el pH se va haciendo alcalino, estos grupos se desprotonan, permitiendo la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos más polares de la molécula (**Figura 60**), conduciendo a la formación de un gel tridimensional (Chenite et al., 2000). Aunque se han descrito otras formas de gelificación del quitosano, como su entrecruzamiento covalente con compuestos aniónicos (Back et al., 1979), en este trabajo se ha inducido la gelificación mediante interacciones iónicas en medio alcalino por ser éste un método más seguro, biocompatible (Berger et al., 2004) y que, además, parece más útil para la construcción de puentes (Ciardelli and Chiono, 2006). Teniendo en cuenta que la

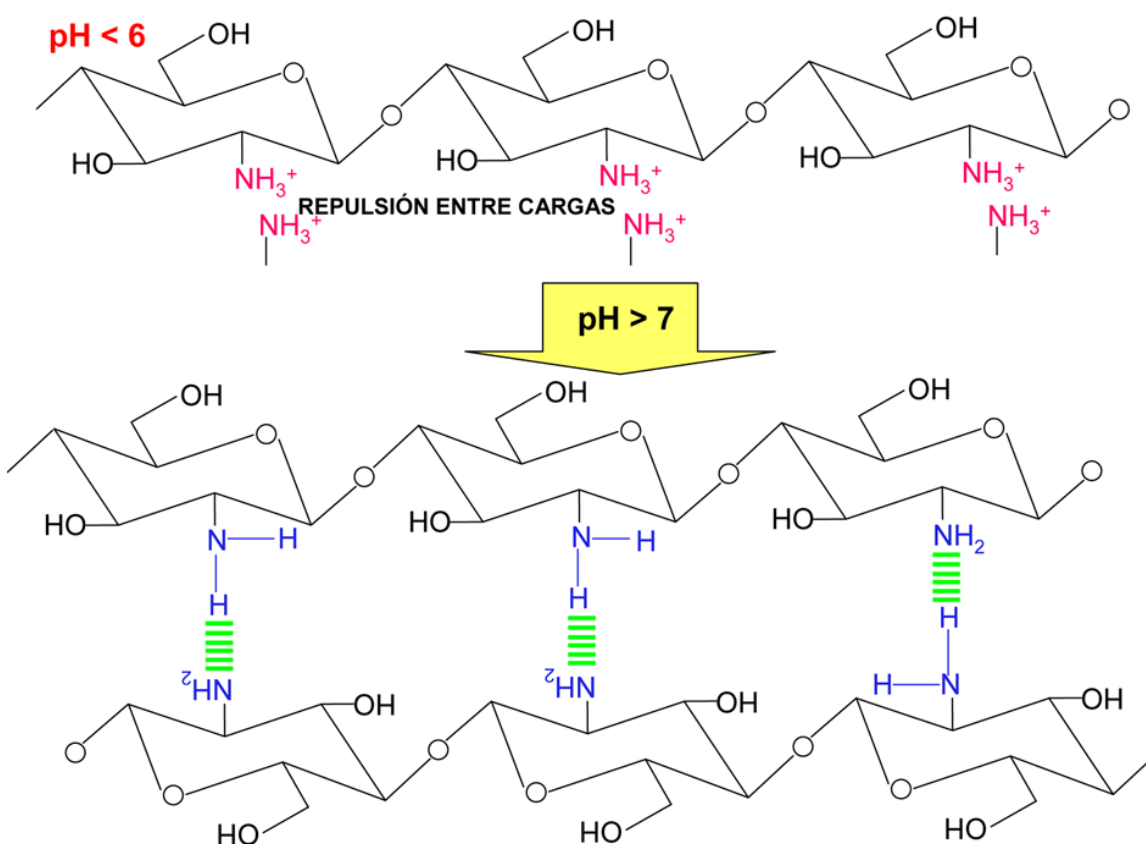


Figura 60: Gelificación del quitosano según al incrementarse el pH. El quitosano se compone de monómeros de $\beta(1,4)$ -2-amino-2-deoxi-D-glucosa que forma cadenas cuyos grupos amino están protonados (-NH_3^+) a $\text{pH} < 6$, impidiendo su interacción por repulsión electrostática. A $\text{pH} > 7$, los grupos amino se desprotonan (-NH_2) y se pueden establecer enlaces de hidrógeno entre ellos, induciendo la gelificación del quitosano.

morfología es similar en los dos geles, el aumento de la concentración de quitosano al doble supone que existe un mayor número de grupos químicos libres por unidad de volumen, que se traduce en un aumento de la rigidez del gel. Este aumento de la rigidez es, probablemente, consecuencia del aumento de los grupos amino libres y de sus más numerosas interacciones electrostáticas intramoleculares por unidad de volumen.

Estas diferencias de su rigidez se reflejaron en las propiedades adhesivas de su superficie. Así, en los estudios de adhesión y proliferación de células C6 y PC12 comprobamos que estas modificaciones dieron lugar a aumentos significativos en las tasas de proliferación de ambos tipos celulares en las superficies de quitosano al 2% con respecto al polisacárido al 1%. Además de los estudios morfológicos por ESEM, se procedió a medir la tensión superficial de las superficies de quitosano al 2% mediante las medidas del ángulo de contacto, para compararlas con las realizadas en el quitosano al 1%. Los estudios de ángulo de contacto, que miden indirectamente el grado de hidrofiliidad de una superficie (Johnson and Dettre, 1969; Hiemenz and Rajagopalan, 1997), mostraron que las superficies de los geles de quitosano al 2% tenían unos ángulos de contacto de unos 83°, muy superiores a los aproximadamente 60-65° descritos para los geles al 1% (Cheng et al., 2003a; Cheng et al., 2003b; Mingyu et al., 2004). Ya que las superficies con ángulos de contacto más bajos son las más hidrofílicas (Vogler, 1988; Vogler, 1999), y que cuanto más hidrofílica sea una superficie más adhesiva es para las células (Grinnell and Feld, 1982; van Wachem et al., 1985; van Kooten et al., 1992; Altankov et al., 1996), el hecho de que las superficies de quitosano 2% sean más proadhesivas se debe, probablemente, a criterios exclusivamente mecánicos como, por ejemplo, que el aumento de la rigidez promueva la adhesión celular, quedando enmascarado el efecto inhibitorio de las superficies más hidrofóbicas. Estos resultados muestran, por primera vez con estos materiales, que la adhesividad de sus superficies se puede alterar no solo por sus propiedades electrostáticas o de polaridad, sino también por otros factores de índole mecánica o estructural pueden resultar más relevantes que los primeros.

El comportamiento de ambos tipos celulares se comparó con superficies control de PLL sin otro biomaterial añadido. Estas superficies se suponían, en principio, más proadhesivas que cualquiera de las dos de quitosano ensayadas, ya que la PLL es una molécula promotora de la adhesión celular (Letourneau, 1975). Sin embargo, tal y como

se ha comentado anteriormente, aunque la PLL sea más hidrofílica que el quitosano al poseer un pKa mayor (Anthonsen et al., 1993), ésta no fue razón suficiente para que fuese la superficie más adhesiva y promotora de la proliferación en ambos tipos celulares, como ocurrió en el caso de las células C6. En el caso de las células PC12 se obtuvo el resultado esperado, es decir, el comportamiento de las células en las tres superficies mostró que los controles con PLL fueron las superficies más pro-adhesivas, con valores de viabilidad significativamente superiores a los del quitosano. Estos datos están de acuerdo con los publicados previamente, en los que la adhesividad de geles de quitosano modificados mediante la adición de PLL mejoraba cuando los geles se hacían más hidrofílicos (Mingyu et al., 2004), reforzando la hipótesis de que las superficies más adhesivas son las más hidrofílicas (Curtis et al., 1983; Owens et al., 1988; Margel et al., 1993). Sin embargo, otras hipótesis que no tienen que ver con la hidrofiliidad explican la menor adhesividad de las células PC12 a las superficies de quitosano con respecto a las controles de PLL. Una de ellas es que el quitosano presenta una estructura química similar a la de los glicosaminoglicanos (GAG) (Xia et al., 2004), y se ha descrito que las células PC12 disminuyen su adhesión cuando se cultivan sobre algunos tipos de GAGs (Akeson and Warren, 1986). Esto indicaría que la menor adhesión al quitosano podría ser debida a que su estructura química es similar a ese tipo de GAGs. En todo caso, el aumento de la actividad metabólica observado en las superficies de quitosano al 2% con respecto a las del 1% se asoció a aumentos en su metabolismo y no a la proliferación de las células, ya que las células PC12 dejan de dividirse cuando se exponen a la neurotrofina NGF (Rudkin et al., 1989).

Las células C6, sin embargo, se comportaron de manera completamente distinta, ya que su tasa de proliferación sobre las superficies de quitosano al 2% fueron significativamente superiores a las observadas tanto en las superficies de quitosano al 1% como en los pocillos control con PLL. En este caso, este comportamiento se achacó a características intrínsecas de las células C6, que se sabe que expresan en su membrana GAG con monosacáridos componentes, como la N-acetilglucosamina, capaces de adherirse a superficies de crecimiento (Berezovskaya et al., 1995). Teniendo en cuenta que el quitosano posee una estructura química similar a los GAG y que favorece la unión o deposición de los mismos (Denuziere et al., 2000; Xia et al., 2004; Tillman et al., 2006), el aumento de la adhesión y proliferación de las células C6 en el quitosano 2% podría ser debido al aumento en la superficies del quitosano de los grupos químicos

promotores de la unión a los GAG, o bien a que su superficie tenga una estructura química similar a los GAG promotores de la proliferación de estas células, como ocurre con algunos GAG adheridos a moléculas de la matriz extracelular como la laminina o la fibronectina (Aguiar et al., 2005).

En vista de estos resultados, parece que el aumento en la concentración de quitosano genera nuevos enlaces intramoleculares que son, probablemente, de tipo electrostático y que se traducen en un aumento de la consistencia y rigidez del gel. Aunque la morfología de los dos geles fue similar, y aunque la polaridad de las superficies de quitosano al 2% hace de ellas, en principio, unas superficies menos adhesivas, probablemente ocurrió algún cambio físico-químico, con modificación mecánica de su estructura, que hicieron de esta superficie un sustrato más adhesivo y promotor de la proliferación celular. Teniendo en cuenta los efectos positivos del aumento de la concentración, proyectamos mejorar las propiedades adhesivas del quitosano modificándole mediante mezclas con gelatina y PLL, como publicó Cheng Mingyu (Cheng et al., 2003b; Mingyu et al., 2004), evaluando el efecto del aumento de la concentración en las propiedades de las mezclas con gelatina y PLL.

5.2. El aumento de la concentración de quitosano al 2% indujo modificaciones en los ratios de mezcla óptimos de gelatina y de poli-L-lisina

La modificación del quitosano con gelatina se planteó debido a la biocompatibilidad y las propiedades proadhesivas y plásticas de la gelatina (Kuijpers et al., 2000). Con ella buscamos mejorar las propiedades físico-químicas del quitosano, convirtiendo a éste en una estructura más elástica, generando así un gel que, al retener mayor cantidad de agua en su estructura, presenta mayor resistencia a la tensión. Por otra parte, buscamos también grupos químicos promotores de la adhesión celular (Yin et al., 1999; Cheng et al., 2003b; Kim et al., 2005). Las modificaciones con PLL pretendían básicamente mejorar las propiedades adhesivas del quitosano aportando grupos hidrofílicos a su estructura (Cheng et al., 2003a; Mingyu et al., 2004). En este trabajo hemos comprobado que el aumento de la concentración de quitosano del 1 al 2% modificó las proporciones óptimas en las que se debe mezclar el quitosano con la gelatina y la PLL para obtener la mezcla más promotora de la emisión y elongación neurítica de células PC12. Los trabajos

realizados por Cheng Mingyu determinaron que la relación óptima para mezclar el quitosano con la gelatina fue de 0.6, y de 0.03 para la PLL. Sin embargo, cuando se duplica la concentración de quitosano los resultados muestran que las relaciones de mezcla óptimas cambian hacia 0.4 para la gelatina y 0.01 para la PLL. Estos cambios se asociaron a modificaciones tanto en el tipo como en el número de las interacciones entre el quitosano con la gelatina y la PLL.

La interacción de ambas moléculas con el quitosano se indujo mediante su mezcla en medio ácido. El quitosano posee una gran cantidad de cargas positivas en su estructura (Horisberger and Clerc, 1988) que facilitan su unión electrolítica con moléculas cargadas negativamente como la gelatina, generando un complejo polielectrolítico (Figura 61A) con una fuerte interacción entre ambos compuestos (Yin et al., 1999; Xia et al., 2004). La PLL, sin embargo, es una molécula cargada también positivamente, por lo que la interacción entre ambos se produjo al inducir la gelificación en medio alcalino, en el cual el quitosano se desprotona y sus grupos amino permiten la interacción con la PLL (Figura 61B), formando lo que se ha denominado una superficie física por interpenetración de una red (SPIN) (Ikada, 1994). El aumento en la concentración de quitosano incrementó, como se ha comentado anteriormente, la presencia de más grupos amino reactivos libres por unidad de volumen, induciendo, probablemente, una mayor interacción con las moléculas de gelatina y de PLL. Estas interacciones, a su vez, tuvieron su reflejo en la polaridad de las superficies, traducido en modificaciones de la hidrofiliidad medida mediante el ángulo de contacto. Así, las medidas de ángulo de contacto de las superficies de quitosano mezclado con gelatina realizadas en este trabajo, mostraron que todas presentaban ángulos de contacto superiores a los descritos hasta la fecha, indicando que tuvieron que existir interacciones entre las moléculas que conducían directamente a la reducción de los grupos químicos polares en su superficie. Ya comentamos anteriormente que el aumento de la concentración de quitosano es capaz de inducir, por sí solo, un aumento del ángulo de contacto desde los 65° descritos, hasta los aproximadamente 80-85° grados registrados en este estudio, indicando así un fuerte aumento de la hidrofobicidad de las superficies. Este aumento también se mantuvo en las mezclas con gelatina. Teniendo en cuenta que observamos un aumento considerable del ángulo de contacto de las superficies de gelatina sin mezclar ($\text{rg} = 1$), pasando de los aproximadamente 50° publicados (Cheng et al., 2003b) a los más de 75° descritos en este trabajo, concluimos que el aumento en la

hidrofobicidad de las superficies fue debido, tanto al aumento de la concentración de quitosano, como al tipo de gelatina utilizada. El hecho de que la gelatina utilizada en este trabajo dé lugar a superficies más hidrofóbicas, se debió, probablemente, a diferencias en el tipo de gelatina utilizada, aunque no pudimos asegurar tal extremo debido a la ausencia de información en las publicaciones sobre la procedencia de la gelatina utilizada. Pero no solo se observó un aumento de la hidrofobicidad en las mezclas, sino que también se anuló el efecto descrito en el que los aumentos de la concentración de gelatina en las mezclas disminuían progresivamente el ángulo de contacto, indicando que las superficies iban siendo cada vez más hidrofílicas, todo ello traducido en un aumento de la adhesión y neuritogénesis de las células PC12 cultivadas sobre ellas (Cheng et al., 2003). Estos cambios se tradujeron en disminuciones en la fracción de células PC12 diferenciadas y en la longitud de sus neuritas cuando son cultivadas sobre superficies con 2% quitosano, comparado con los datos para superficies al 1%. Las causas más probables de esta disminución pudieron ser que las superficies son más hidrofóbicas y por ende menos adhesivas, combinado con un enmascaramiento por el quitosano de los grupos pro-adhesivos de la gelatina. El aumento en la concentración de quitosano provocaría, de este modo, un aumento en las interacciones electrostáticas con la gelatina, lo que bloquearía los grupos pro-adhesivos para las células PC12, pasando a formar parte del complejo polielectrolítico. Los estudios con cultivos mostraron, además, una homogeneización del comportamiento adhesivo en todas las mezclas, eliminándose las diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Estas observaciones apuntan de nuevo al enmascaramiento de los efectos pro-adhesivos de la gelatina por el quitosano, que quedaron anulados. Por esta razón, al elegir la relación óptima en la mezcla del quitosano con gelatina, atendimos a cuestiones exclusivamente numéricas, es decir, elegimos la mezcla que indujo el porcentaje más alto de neuritas más largas tras los 6 días del experimento aunque no existieran diferencias relevantes entre las distintas superficies. De este modo el ratio óptimo para la gelatina pasó del 0.6 descrito para quitosano al 1% (Cheng et al., 2003b) al 0.4.

El estudio con PLL mostró resultados de adhesión similares a los observados con gelatina. El incremento en la concentración de quitosano en este caso también indujo un enmascaramiento de los grupos pro-adhesivos de la PLL, que tuvo como resultado porcentajes de diferenciación y elongación neurítica de las células PC12 inferiores a los descritos para los geles al 1% (Mignyu et al., 2004). También se anuló el efecto pro-

adhesivo del aumento en la concentración de PLL sobre los geles de quitosano al 1% (Mignyu et al., 2004), lo que apuntó nuevamente al enmascaramiento descrito. Teniendo en cuenta que el incremento en la adhesividad por la PLL fue consecuencia del aumento de las cargas positivas en las mezclas, al aumentar los grupos amino libres adhesivos (Cheng et al., 2003a; Mignyu et al., 2004) que causaban un incremento en la tensión superficial (Chau and Porter, 1991), la disminución de la adhesividad tuvo deberse a una disminución de estos grupos, que probablemente estarían implicados en la formación de interacciones electrostáticas intramoleculares. Este aumento de estas interacciones tuvo como consecuencia la aparición de superficies más hidrofóbicas, como se comprobó en la parte del trabajo en que medimos el ángulo de contacto para los geles con una relación en peso de PLL de 0.01. Aunque no se tomaron medidas del ángulo de contacto para el resto de las mezclas con PLL, las observaciones para una relación de 0.01 sugieren un comportamiento similar al observado para las mezclas con gelatina, es decir, que en todos los casos la hidrofobicidad fue mayor y que no se observaron diferencias entre las mezclas. El estudio de diferenciación y neuritogénesis realizado con las células PC12 mostró nuevamente el enmascaramiento del efecto de la PLL en los geles, porque en todos los casos ambos parámetros fueron inferiores a los geles al 1% y, además, se produjo una normalización de las distintas mezclas. Todos estos datos sugieren que es probable que el aumento de la concentración de quitosano aporte a las mezclas una cantidad de grupos reactivos libres suficientemente alta como para reaccionar con todos los grupos adhesivos de la PLL, incluso manteniendo las proporciones en peso descritas para los geles de quitosano al 1%, bloqueando el efecto de la PLL. Al igual que ocurría con la gelatina, el grupo control formado en este caso por superficies de colágeno también resultó ser menos promotor de la neuritogénesis. Nuevamente estas diferencias pueden ser achacadas, o bien a las diferencias con el tipo de colágeno utilizado, o bien a diferencias en la metodología empleada en cada estudio, aunque no se ha comprobado este extremo. Para elegir la relación de mezcla óptima entre quitosano y PLL, se optó nuevamente por seguir un criterio numérico, al que se sumó un criterio de promoción de la diferenciación a largo plazo, es decir, elegimos aquellas mezclas que promoviesen tras los 5 días del estudio. Aunque PL-0.5 y PL-1 tuvieron valores de diferenciación y longitud neurítica similares, el hecho de que tras 5 días en cultivo únicamente aumentase la adhesión y emisión neurítica en PL-1 ($r_{PLL} = 0.01$), condujo a elegir a esta mezcla como la idónea para modificar el quitosano con PLL. Al ser implantado en

modelos in vivo, se requerirán tiempos de supervivencia largos, implicando que los datos a más largo plazo sean los modelos más próximos. Por ello, modificamos la relación óptima para geles al 1% desde los 0.03 a 0.01 de PLL.

5.3. La mezcla de *quitosano* + *gelatina* es la óptima para su utilización in vivo

La siguiente parte del trabajo fue establecer cual de las mezclas del quitosano con gelatina o PLL de las anteriormente estudiadas, más la mezcla de los tres componentes, era la óptima para construir puentes implantables en lesiones medulares. Tras un estudio de adhesión y proliferación con células propias del SNC y ensayos de extensión neurítica con ganglios de la raíz dorsal (GRD) establecimos que la mezcla de *quitosano* + *gelatina* es la más pro-adhesiva, y, por tanto, la óptima para construir puentes para la reparación medular. Los estudios con astrocitos y neuronas pretenden, además, arrojar algo de luz sobre el comportamiento que tienen estas células, constituyentes propios del SNC, en biomateriales susceptibles de ser implantados en animales de experimentación.

5.3.1. La interacción entre el quitosano, la gelatina y la PLL da lugar a distintos complejos polielectrolíticos

El estudio físico-químico mostró que las interacciones entre los tres compuestos fueron de tipo electrolítico, dando lugar a cambios en las propiedades adhesivas y estructurales de las mezclas. Mediante la técnica de espectrofotometría infrarroja (FTIR) y RAMAN (ER), estudiamos los tipos de enlaces de las moléculas en base a las energías de vibración molecular. Los estudios realizados en este trabajo con las mezclas de quitosano, gelatina y PLL mostraron ligeros desplazamientos en los picos de absorción de energía de vibración molecular, asociados a interacciones electrostáticas entre los compuestos cuando éstos son mezclados. Esta hipótesis ya fue planteada en otros trabajos en los que estos desplazamientos se asociaron a nuevas interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno o interacciones de Van der Waals, que provocaron ligeros cambios en la estructura de los compuestos (Taravel and Domard, 1993; Yin et al., 1999; Cheng et al., 2003b). Estas técnicas confirmaron que la metodología utilizada en nuestro trabajo para modificar el quitosano, consistente en mezclar los compuestos, dio lugar únicamente a interacciones electrostáticas débiles entre los grupos iónicos funcionales de los polímeros (**Figura 61**). Estas interacciones ocurren porque el

quitosano, como la molécula polar y policationica que es debido a la presencia de grupos funcionales amino e hidroxilo libres en su estructura (Kim et al., 2008), interacciona electrostáticamente con los grupos iónicos funcionales libres en la gelatina y la PLL. Así, la interacción con la gelatina se tiene que producir a través de los grupos carboxilo libres de ésta (**Figura 61A**). Los grupos carboxilos libres de la gelatina se originan en el proceso de obtención de la misma. Aunque existen varios procedimientos, la gelatina utilizada en este trabajo se obtuvo mediante un tratamiento alcalino que hidroliza los grupos amido de los residuos de asparagina y de glutamina a grupos carboxilos, convirtiendo muchos de estos residuos en aspartato y glutamato, que confieren carga negativa a la molécula y un punto isoeléctrico bajo (Ikada and Tabata, 1998). Sin embargo, la interacción con la PLL, que también es una molécula catiónica (Siegel and Daly, 1966), se produjo bien por diferencias de carga positiva a pH neutro como consecuencia de su diferente punto isoeléctrico (Anthonsen et al., 1993) (**Figura 61B**), o bien por la capacidad de unión de la PLL a GAG como la heparina (Stone and Epstein, 1977). Así, la PLL tendría facilidad para unirse al quitosano como molécula con estructura sacarídica similar a los GAG (Denuziere et al., 2000; Xia et al., 2004; Tillman et al., 2006). Además de estas interacciones entre quitosano, gelatina y PLL, el desplazamiento de las energías de vibración molecular (picos en el gráfico) observado en la mezcla de los tres componentes, fue distinto al observado en los materiales sin mezclar y en las mezclas binarias, indicando una interacción electrostática adicional entre la gelatina y la PLL (**Figura 61C**). Como comentamos anteriormente, la naturaleza catiónica de la PLL y la aniónica de la gelatina apuntan a que la interacción entre ambas sea un hecho probable, lo que comprobamos en este trabajo como cambios en las energías de vibración de las moléculas. La interacción entre los tres polímeros creemos que tendría lugar entre los grupos amino e hidroxilo del quitosano, los grupos amino y carboxilo de la gelatina y con los grupos amino y amido de la PLL, dando lugar a una estructura tridimensional fruto del entrecruzamiento de las cadenas de los polímeros. Otras observaciones interesantes fueron las diferencias en las energías de vibración de los enlaces con respecto a lo descrito en la bibliografía por otros autores. Por ejemplo, el grupo amido I del quitosano aparece en este trabajo en 1685cm^{-1} medido por FTIR, mientras que en otros trabajos aparece en 1665cm^{-1} (Prashanth et al., 2002), un comportamiento que también se observó en grupos similares de la gelatina. Como indicamos anteriormente, el aumento de la concentración de quitosano indujo modificaciones en sus propiedades

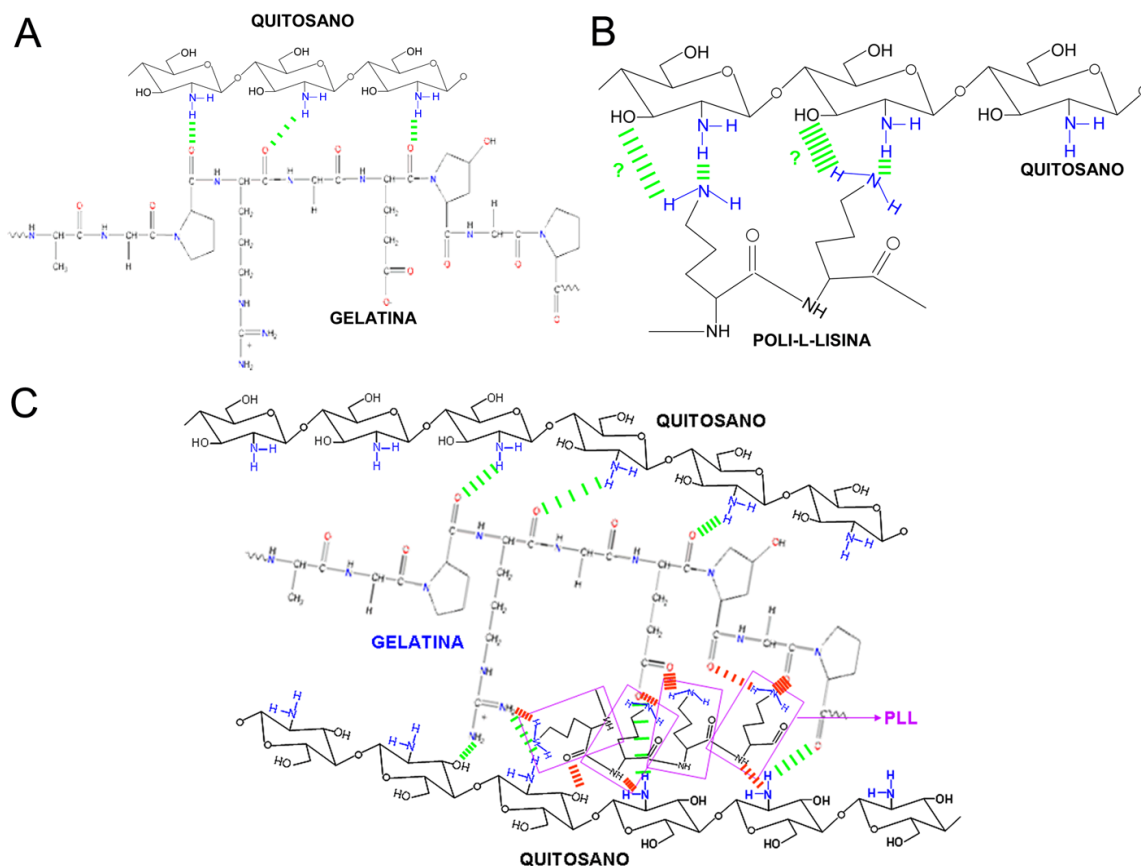


Figura 61: Interacción entre el quitosano, la gelatina y la poli-L-lisina. (A) Interacciones electrostáticas por puentes de H (líneas verdes) entre los grupos amino del quitosano y el oxígeno del enlace peptídico de la gelatina, aunque probablemente existan más interacciones entre otros grupos según se va adquiriendo una estructura terciaria; (B) interacción electrostática (líneas verdes) entre los grupos amino del quitosano y el amino de la PLL, donde se propone, entre otras, una interacción entre el hidroxilo libre del quitosano con el amino de la PLL; (C) interacciones electrostáticas entre el quitosano y la gelatina, entre el quitosano y la PLL (líneas verdes), y entre la gelatina y la PLL (líneas naranjas). Estas tres moléculas adquirirán una estructura terciaria donde, probablemente, se producirán más interacciones entre el resto de grupos químicos reactivos de los tres polímeros.

adhesivas debido, probablemente, a un aumento en las interacciones electrostáticas intramoleculares. Estas interacciones, o el tipo de metodología empleada para preparar las muestras, pudieron ser las responsables de los desplazamientos energéticos observados con respecto a lo descrito por otros autores. Es de interés notar que la mayoría de los estudios realizados por FTIR y ER se llevaron a cabo a partir de soluciones de quitosano al 1% (Cheng et al., 2003b) o procedentes de desacetilaciones directas de la quitina (Taravel and Domard, 1993; Van de Velde and Kiekens, 2004; bdel-Fattah et al., 2007), lo que complica las comparaciones con las soluciones al 2% de este estudio. Con las técnicas físico-químicas utilizadas en este trabajo hemos comprobado,

por una parte, el tipo de interacciones entre los tres compuestos, y por otra, que las interacciones entre los polímeros explicaban las propiedades físicas de los materiales en cuanto a porosidad, induciendo variaciones que también pudieron ser observadas mediante el estudio morfológico por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM). El estudio por ESEM mostró que la mezcla de *quitosano + gelatina* fue la más compacta, presentando un tamaño aparente de poro más pequeño. Esto apunta a que la cantidad o intensidad de las interacciones electrostáticas entre los dos compuestos fueron superiores a las de las restantes mezclas, y que la presencia de PLL en la mezcla atenuaba a su vez este efecto en la mezcla de los tres componentes, aunque las técnicas utilizadas en este trabajo no permiten determinar estos parámetros. El resultado del aumento en el número o intensidad de las interacciones dio lugar a una mayor compactación de la estructura de los geles de *quitosano + gelatina*. Estas conclusiones han sido sugeridas previamente en trabajos que partían de geles hidratados de quitosano con gelatina, donde el estudio mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) permitió comprobar que el aumento en la proporción de quitosano en las mezclas correlacionaba con una disminución de la cantidad de agua en las mismas, debido a que las fuertes interacciones entre los dos compuestos que reemplazan las interacciones de solvatación por agua de las cadenas macromoleculares (Yin et al., 1999; Cheng et al., 2003b). Estos datos, obtenidos a partir de estudios realizados a temperaturas en torno a los 200°C, no tuvieron su reflejo en este trabajo porque todas las muestras presentaron una capacidad similar de retención de agua, medido por DSC a temperaturas en torno a los 100°C. La causa de este comportamiento se encuentra, probablemente, en la técnica utilizada para realizar los DSC a partir de los materiales liofilizados y no hidratados, en los cuales prácticamente no existe agua retenida. Donde se observaron diferencias fue a temperaturas superiores a los 200°C. bdel-Fattah y col (2007) describieron que por encima de los 200°C el quitosano se encuentra completamente degradado, por lo que los procesos que se reflejan aquí, teniendo en cuenta que la técnica de DSC se realiza en atmósfera no oxidativa, se asocian a distintas reacciones de pirólisis de los materiales.

Un estudio más detallado de los procesos de pirólisis de los materiales se realizó por análisis termogravimétrico (ATG) en atmósfera no oxidativa (atmósfera con N₂). Está descrito que la temperatura de pirólisis de la quitina se encuentra en torno a los 400°C (Franich and Goodin, 1984; Marbot, 1997), por lo que los picos de pirólisis que aparecen en torno a esta temperatura se asocian, en el caso del quitosano al 2%, a la

pirólisis de restos de la quitina presentes en la muestra. Sin embargo, cuando el quitosano se mezcló con la gelatina y la PLL, la pérdida de peso a esta temperatura fue mucho más acusada que en el quitosano sin mezclar, lo que indica que se corresponde con el proceso de pirólisis de la gelatina, la PLL o de porciones del quitosano unidas a estas moléculas. El hecho de que en la mezcla de los tres componentes desaparezca el pico pirolítico en torno a los 400°C es otra indicación de la presencia de una interacción entre esos dos compuestos que formarían un compuesto electrolítico cuya temperatura de pirólisis se situaría a temperaturas inferiores. Por lo tanto, estas observaciones, unidas a los cambios observados en la DSC y en las energías de vibración moleculares por FTIR y ER, permiten concluir la existencia de interacciones de tipo electrolítico entre la gelatina y la PLL que no han descritas hasta la fecha. Estas interacciones también se reflejaron en la morfología de los geles resultantes de la mezcla de los tres compuestos estudiada por ESEM, una morfología regular que sugiere que la interacción entre ellos dio lugar a reordenamientos moleculares de las cadenas que aportaban regularidad a la mezcla. Otra forma de comprobar la existencia de interacciones electrolíticas entre estos polímeros fue el estudio de su degradación por ATG en atmósfera oxidativa. Las modificaciones del quitosano alteran su estabilidad térmica (Jayakumar et al., 2008; Luo et al., 2008) y, teniendo en cuenta como las mezclas ensayadas en este trabajo dan lugar a distintos complejos polielectrolíticos, el análisis de degradación ATG también mostró que interacciones con gelatina y PLL alteran la estabilidad térmica del quitosano. Por último, las interacciones entre los tres compuestos analizados en este trabajo dieron lugar a alteraciones en el tipo y tamaño de poros de las mezclas. Como no se pudo calcular el tipo y distribución de los poros, al ser estructuras macroporosas, se realizaron isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno para calcular la superficie específica (SE) de cada muestra. Esta técnica permite estudiar estructuras micro- o mesoporosas (Brunauer et al., 1940). Las SE descritas en la literatura oscilan bastante, dependiendo del tipo de material y la metodología utilizada. Han sido descritas SE desde 98m²/g para quitosano entrecruzado con glutaraldehído y concentración del 4% (Merrifield et al., 2004), hasta aproximadamente 30m²/g para quitosano de concha de cangrejos (Evans et al., 2002), los 0.3-1.6m²/g de quitosano sin secar o 0.7-3m²/g de quitosano secado con pistola (Rege et al., 2003). Con otro tipo de materiales, como el alginato, se ha informado que la SE nunca supera 1m²/g para material liofilizado, aunque supera los 500m²/g si no lo está (Valentin et al., 2005). Por tanto, la causa más probable de que encontrásemos

bajos niveles de SE, que no superaron en ningún caso los 4m²/g en el presente trabajo, fuera el hecho de haber realizado las medidas con materiales liofilizados. Con esta técnica se pudo avalar, nuevamente, la hipótesis de que las interacciones electrolíticas entre el quitosano y la gelatina fueron de mayor intensidad que entre el resto de compuestos, ya que presentaron la menor SE de todas ellas. Para caracterizar correctamente los cambios en la porosidad se recurrió a la porosimetría de mercurio. En todos los casos se comprobó que las mezclas de quitosano cumplieron el 30% de porosidad mínima descrita como necesaria para los materiales destinados al implante (bdel-Fattah et al., 2007), aunque uno de ellos, la mezcla de *quitosano + gelatina*, no superó el 50% descrito como el mínimo para obtener una respuesta tisular adecuada (Woerly et al., 1991). Sin embargo, en los estudios con cultivos celulares esta mezcla fue la más promotora del crecimiento, por lo que se concluye que los requisitos de un material para su uso *in vivo* no tienen por que ser los mismos que para los cultivos *in vitro*, dependiendo del tipo de material. Nuevamente observamos que las interacciones que hubo entre el quitosano y la gelatina fueron más fuertes que entre quitosano y PLL o en la mezcla de los tres componentes, y que esta disminución de la porosidad y de la SE es promotora del crecimiento celular y elongación neuríticas, probablemente porque se exponen en la superficie más grupos pro-adhesivos para las células y las neuritas, aunque no se determinaron cuales eran estos grupos.

5.3.2. Las superficies de *quitosano+gelatina* promovieron la adhesión neuronal y la proliferación de células gliales

Para comprobar cual de las mezclas de quitosano con la gelatina y la PLL era superior en adhesividad y promoción del crecimiento, estudiamos el comportamiento en esas superficies de distintos tipos celulares propios del SNC. Estos son los primeros estudios con estas células sobre el quitosano y este tipo de mezclas. Cuando ocurre una lesión medular, la pérdida de neuronas y células gliales es uno de los eventos más importantes que debemos reparar, procurando recuperar al máximo la homeostasis interna. Para estudiar el comportamiento de las células neurales sobre los materiales susceptibles de ser implantados, cultivamos sobre las mezclas de quitosano dos tipos de neuronas centrales, de corteza e hipocampo. Las superficies hidrofílicas, como las recubiertas de PLL, promueven la adhesión neuronal (Yavin and Yavin, 1980). Así, en este trabajo comprobamos que las superficies (plástico de los pocillos solo o recubierto

con PLL) promovieron la adhesión y neuritogénesis de ambos tipos neuronales, indicando que el material de que están construidas las placas (poliestireno) posee grupos pro-adhesivos que son reforzados por la presencia de PLL en su superficie. Estas observaciones son, entre otras, el motivo por el cual varios autores han utilizado la PLL para modificar el quitosano y hacer de él un polímero más adhesivo (Cheng et al., 2003a; Mingyu et al., 2004). Sin embargo nosotros observamos que la PLL mezclada con quitosano simplemente permitió la adhesión y crecimiento neuronal de manera similar a lo registrado para quitosano sin mezclar, lo cual refuerza nuestra hipótesis, anteriormente discutida, de que el aumento en la concentración de quitosano bloquea los sitios proadhesivos de la PLL. Además de este bloqueo, ni las neuronas, ni las células gliales utilizadas en este trabajo, las cuales no pudieron crecer sobre las superficies de *quitosano + gelatina + PLL*, avalando la hipótesis propuesta a partir del estudio físico-químico de la existencia de una interacción electrostática particular entre la gelatina y la PLL que parece bloquear los sitios de unión de ambas moléculas. Aunque no observamos diferencias en adhesión y supervivencia de las neuronas en los distintos biomateriales, se detectaron pequeños cambios fenotípicos en los marcadores utilizados, indicando que las variaciones de adhesividad registradas en las distintas superficies afectan a la expresión génica neuronal, siendo los responsables de esos cambios fenotípicos.

Realizamos el estudio con los dos tipos gliales porque los astrocitos son las células más abundante del SNC y regulan, entre otros, el metabolismo de las neuronas (Pellerin et al., 2007), el acceso de sustancias del flujo sanguíneo al SNC, a través de la barrera hematoencefálica (Jakovcevic and Harder, 2007), o la respuesta a una lesión del SNC (Vaccharino et al., 2007); y por otra parte, el tipo celular más utilizado en trasplantes para promover la reparación de la médula espinal lesionada, que es la *glía envolvente de bulbo olfativo* (Ramon-Cueto and Nieto-Sampedro, 1994; Taylor et al., 2001; Nieto-Sampedro, 2003; Fairless and Barnett, 2005; Barnett and Riddell, 2007; Franssen et al., 2007). Ambos tipos celulares presentaron un comportamiento similar en las distintas superficies ensayadas. La PLL, una molécula que promueve la adhesión y proliferación de los astrocitos (Thangnipon et al., 1983) y de la GEBO (Gudiño-Cabrera and Nieto-Sampedro, 1996), se mostró promotora de la proliferación de éstas células únicamente cuando se encuentra en los pocillos sin biomaterial (controles). Con estas observaciones concluimos, nuevamente, que el quitosano a la concentración del 2% es responsable del

bloqueo de los sitios pro-adhesivos de la PLL. Sin embargo, en el caso de la gelatina, el comportamiento celular cambió radicalmente. La mezcla de *quitosano + gelatina* promovió la proliferación de la GEBO durante todo el estudio. Teniendo en cuenta que las superficies de quitosano al 2% inhiben la adhesión y proliferación de las células, el hecho de que la mezcla de *quitosano + gelatina* promueva su proliferación tuvo que ser debido, necesariamente, a la presencia en la mezcla de la gelatina. Con las mezclas de quitosano al 1% se demostró que la presencia de la gelatina promovía la adhesión de las células PC12 (Cheng et al., 2003b) o de fibroblastos (Kim et al., 2005). Sin embargo, en este estudio hemos visto que al aumentar la concentración de quitosano, el efecto promotor de la adhesión y la neuritogénesis de la gelatina sobre cultivos de PC12, desaparecía. No existen datos sobre la adhesión y proliferación de los astrocitos y la GEBO en estas superficies, pero es posible que los grupos pro-adhesivos de la gelatina sean diferentes para distintos tipos celulares, mostrándose en todos esos casos promotora de la adhesión y proliferación. Por tanto, teniendo en cuenta que las neuronas sobreviven mejor sobre monocapas de astrocitos comparado con superficies recubiertas de PLL (Yoshida et al., 1986), el hecho de que los astrocitos proliferen sobre las superficies de *quitosano + gelatina* probablemente ayudó a las neuronas a crecer sobre esta superficie, apuntando a la necesidad de que este biomaterial sea invadido en primer lugar por astrocitos antes de promover el crecimiento neuronal. Del mismo modo, el que esta mezcla promueva la adhesión y proliferación de células de GEBO es importante si estas células son transplantadas conjuntamente con este biomaterial. Se sabe que las células de GEBO promueven el crecimiento y elongación neuríticas (Cancalon, 1987; Kafitz and Greer, 1998; Kafitz and Greer, 1999) y ayudan a la regeneración axonal tras lesiones de médula espinal (ver citas de la página anterior). Esto hace de la GEBO un candidato ideal para promover la regeneración axonal, demostrada en estudios de extensión neurítica *in vitro* (Leaver et al., 2006). El que las superficies de *quitosano + gelatina* sean promotoras de la proliferación de estas células tiene un valor especial para la reparación de lesiones con ayuda de puentes de esta mezcla.

Como observamos con las neuronas, el tipo de sustrato influyó no solo en la adhesión y proliferación celular, sino también en la expresión génica, y, por ende, en el fenotipo de las células gliales. En el caso de las células de GEBO no se observaron cambios fenotípicos porque de los dos marcadores utilizados, el único detectado fue el receptor p75, típico de estas células (Assouline and Pantazis, 1989) y no se perdió nunca.

En cambio, se observaron variaciones en la expresión de los dos marcadores de astrocitos utilizados, la proteína GFAP y la Vimentina. Puesto que vimentina se expresa fundamentalmente en el citoesqueleto de los astrocitos inmaduros, pasando a expresarse GFAP en el curso de su maduración (Pixley and de, 1984), estos marcadores permitieron identificar distintos estados de maduración astrocitaria en las distintas superficies. En las superficies que contenían quitosano sin PLL y en las controles (plástico de las placas y plástico + PLL), se expresaron los dos marcadores con distintas intensidades, indicando la coexistencia de astrocitos maduros, inmaduros y de todos los estadios de maduración intermedios. Puesto que los astrocitos capaces de proliferar pierden la expresión de la proteína GFAP, manteniendo la expresión de vimentina (Selmaj et al., 1991), en este trabajo asociamos las células vimentina-positivas a células proliferativas y aquellas casi exclusivamente GFAP-positivas a astrocitos maduros que no proliferan. Una de las superficies en las que la práctica totalidad de las células fueron positivas para vimentina pero negativas para GFAP fue la gelatina. El aumento progresivo de los valores de MTT indicó que existió proliferación, hasta llegar a ocupar la totalidad del fondo de los pocillos. Sin embargo, los valores de MTT fueron muy inferiores a los observados en los controles o en las superficies de *quitosano + gelatina*, donde también alcanzaron la confluencia, indica que estas células tienen probablemente una actividad metabólica muy inferior. Además de estos cambios fenotípicos, también observamos cambios morfológicos en los astrocitos, particularmente notables en las superficies de gelatina, donde las células adquirieron la morfología poligonal y abundante citoplasma típicos de astroblastos. Teniendo en cuenta que la gelatina utilizada está cargada negativamente (Ikada and Tabata, 1998), es probable que los grupos químicos aniónicos induzcan cambios morfológicos en los astrocitos, dando lugar a células inmaduras y con citoplasma extendido, mientras que la presencia de quitosano, un polication (Madihally and Matthew, 1999; Kim et al., 2008), revierta este efecto. Es, sin embargo, probable que en la morfología adoptada por las células influyan otros factores además de la carga eléctrica. El efecto de la gelatina sobre la morfología celular también fue observado en las células de GEBO. Estas cambiaron desde una morfología fusiforme a una aplanada y poligonal. Estos cambios morfológicos describen un nuevo comportamiento de las células al crecer sobre superficies cargadas negativamente. Hasta ahora se pensaba que las superficies cargadas negativamente inducían menor adhesión y expansión citoplasmática (Lee et al., 1997). Además de estos cambios, las células de GEBO

mostraron otro comportamiento atípico cuando crecían sobre las superficies de *quitosano* + *gelatina*, observándose una respuesta inesperada de crecimiento celular alineado. Este comportamiento fue similar al observado en cultivos sobre superficies de materiales con fibras alineadas, donde se registraron respuestas de crecimiento celular alineado al cultivar sobre superficies de materiales con fibras alineadas (Dubey et al., 1999; Dubey et al., 2001; Subramanian et al., 2005; Zhong et al., 2006; Patel et al., 2007). De este modo, las respuestas encontradas en la GEBO sobre la mezcla de *quitosano* + *gelatina* se relacionaron con la formación de paquetes de fibras de quitosano-gelatina alineadas que inducirían este tipo de respuestas en la GEBO.

En conclusión, el efecto que la gelatina tuvo al mezclarse con el quitosano fue promover la adhesión y proliferación de células gliales y de permitir la adhesión neuronal. Teniendo en cuenta que el quitosano no induce adhesión ni proliferación de estas células, y que la gelatina promueve proliferación celular pero con una actividad metabólica inferior e induciendo una morfología poligonal, el hecho de que la mezcla de *quitosano* + *gelatina* promueva la proliferación de células gliales a niveles prácticamente similares a los controles e induciendo morfologías nuevas, con procesos celulares alargados, indica que las interacciones que tuvieron lugar entre esos dos compuestos causó la aparición de nuevos grupos adhesivos, que no existían ni en el quitosano ni en la gelatina. La metodología empleada en este estudio, y la práctica inexistencia de bibliografía sobre las interacciones entre el quitosano y la gelatina impidió determinar cuales y en qué número fueron estas interacciones. Paralelamente, y como consecuencia de la alineación celular observada como respuesta en las células de GEBO, proponemos que estos dos polímeros formaron fibras alineadas al asociarse. Por el contrario, la mezcla con PLL nuevamente indicó que el quitosano bloquea los grupos pro-adhesivos de esta molécula.

5.3.3. La mezcla de *quitosano* + *gelatina* promueve la emisión y extensión neuríticas a partir de ganglios de la raíz dorsal

Como comentamos anteriormente, la mezcla de *quitosano* + *gelatina* presenta excelentes cualidades de adhesión y proliferación de células propias del SNC, que hacen de ella un candidato ideal para su uso en ingeniería de tejidos. El ensayo definitivo que condujo a la elección de esta mezcla para construir puentes para la reparación medular

fue el estudio de extensión neurítica con GRD. Los resultados encontrados indican que la mezcla de *quitosano* + *gelatina* es una superficie particularmente idónea para promover la extensión neurítica, siendo incluso superior a las superficies control con PLL. Teniendo en cuenta que sobre las superficies de quitosano, cargadas positivamente, y sobre las de gelatina, cargadas negativamente, los GRD prácticamente no emiten neuritas, concluimos de nuevo que la mezcla generó nuevos grupos químicos pro-adhesivos o, como ya se comentó antes, causó modificaciones estructurales particularmente adecuadas para promover la emisión y extensión neuríticas. En algunos trabajos ha sido utilizado el quitosano para introducir cargas positivas en geles no polares, como la agarosa, observándose que se promovía la emisión y elongación neurítica (Dillon et al., 1998; Dillon et al., 2000), mientras que otros autores aseguran que estas cargas son responsables de promover la extensión de neuritas de GRD (Freier et al., 2005). Estos datos llevan a especular que los grupos químicos que la mezcla presenta en su superficie son responsables de la extensión neurítica posiblemente por grupos químicos cargados positivamente. Hemos observado también que geles anisotrópicos (con propiedades que varían en función de la dirección en que son estudiados), promueven la emisión y elongación de neuritas de GRD (Dodla and Bellamkonda, 2006). En la sección anterior postulamos que debido a la respuesta de crecimiento alineada de la GEBO, es posible que la mezcla de *quitosano* + *gelatina* contenga fibras alineadas en su estructura, y sea la responsable de promover el crecimiento de neuritas de los GRD.

Una vez terminados estos estudios, preparamos puentes de *quitosano* + *gelatina* para implantarlos en modelos *in vivo* de lesión medular y estudiar si se obtenían las respuestas observadas *in vitro*.

5.4. Los puentes de *quitosano* + *gelatina* implantados tras una transección medular no promueven la regeneración axonal ni recuperación funcional

Hasta este momento, hemos descrito toda una serie de efectos positivos de la mezcla de *quitosano* + *gelatina* ha tenido para su uso en ingeniería de tejidos aplicada a la reparación nerviosa. Sin embargo, la utilización de estos compuestos como puentes en la reparación de lesiones medulares no está respaldada únicamente en este comportamiento. Está descrito asimismo que el quitosano ayuda en procesos de

cicatrización e inducción de hemostasis tras heridas de piel abiertas (Ueno et al., 2001; Kim et al., 2008), y que la gelatina, en estado esponjoso, promueve la coagulación y, por lo tanto, la hemostasis (Schonauer et al., 2004), convirtiendo a estos compuestos en dos excelentes ayudas para la reparación de transecciones medulares que cursan con fuertes hemorragias y causan gran destrucción de tejido. Estas propiedades intrínsecas del quitosano y la gelatina, por tanto, ayudan en la cicatrización necesaria tras la lesión. Para unir los puentes al tejido nervioso, acercando los mismos a los muñones medulares, utilizamos como adhesivo fibrina (preparado comercial Tissue-Col), que ha sido descrita como ayuda en el sellado de puentes a los nervios (Robinson and Madison, 2000). Como resultado de estos tratamientos, los puentes implantados permanecieron fuertemente unidos a los muñones medulares, acercando el tejido nervioso al material implantado y cumpliendo con una de las principales premisas de un puente destinado a reparar estas lesiones, acercar al máximo el material implantado con los extremos axonales interrumpidos (Geller and Fawcett, 2002). Una característica observada en todos los individuos, tanto implantados como controles, fue la aparición de una banda de células fuertemente empaquetadas rodeando los muñones medulares por su región exterior y formando una matriz fibroso-celular que promovió el crecimiento e invasión de neuritas y de células promotoras de la regeneración, como las células de Schwann (CS). La aparición de esta región, llamada por algunos autores “zona de transición” ha sido asociada a procesos de retracción de los muñones medulares (Novikova et al., 2008; Olayo et al., 2008). En este trabajo ha sido denominada *región de alta densidad celular (radc)*, basado en que se determinó que presentaba características especiales, como son contener una densidad celular excepcionalmente alta comparado con el resto de regiones extramedulares y ser una región fuertemente promotora de la neuritogénesis e invasión de CS.

Otra ventaja de la colocación de los puentes fue la reducción del volumen quístico postlesión, reduciendo así la distancia entre los terminales axonales lesionados y el puente. Sin embargo, la capacidad de reducir los quistes no es específica de este tipo de materiales, ya que resultados similares han sido descritos tras la colocación de otro tipo de implantes (Giannetti et al., 2001; Kataoka et al., 2004; Hejcl et al., 2008). Aunque se observaron efectos positivos en los animales implantados, ni los puentes ni la estrategia combinada con transplantes de GEBO consiguió promover la regeneración de axones del tracto corticoespinal (TCE) o de otros axones supraespinales a través de la cicatriz glial.

La ausencia de regeneración de los axones del TCE ya ha sido descrita por otros autores que utilizaron otro tipo de biomateriales como el ácido poliláctico (Deumens et al., 2006), sin observar marcaje del TCE ni en el tejido medular ni en el interior de los puentes. Según algunos autores, la ausencia de regeneración se debe a las dificultades de los axones del TCE para presentar respuestas de crecimiento y a la presencia de moléculas inhibitorias de la cicatriz glial, apuntando a ésta como la principal responsable de la ausencia de regeneración (Deumens et al., 2005). En este trabajo pudimos comprobar que esta hipótesis es la más probable para explicar la ausencia de regeneración, porque observamos un marcaje intenso de la proteína GFAP, un marcador típico de los astrocitos reactivos de la cicatriz glial, alrededor de los muñones, (Fawcett and Asher, 1999). Aunque no marcamos ningún otro tracto axonal supraespinal, la ausencia total de recuperación funcional en todos los grupos indica que, probablemente, no se produjo regeneración central de ninguno de ellos. Aunque se ha descrito que las células de GEBO ayudan a reducir la gliosis reactiva (Verdu et al., 2001), el trasplante de estas células no disminuyó la gliosis ni promovió regeneración axonal a través de la cicatriz, probablemente porque no pudieron migrar a través de la misma (Ruitenberg et al., 2002; Lee et al., 2004). Este extremo no se pudo comprobar como consecuencia de la pérdida del trazador CFDA-SE, probablemente debido a que el tiempo de supervivencia excesivamente largo de los animales, que condujo a la fotólisis del colorante. Está descrito un fuerte apagamiento del fluoróforo tras sólo 2 semanas de supervivencia en animales transplantados (Andrews and Stelzner, 2004).

La inmunotinción con el marcador neurítico anti-neurofilamento, realizada para estudiar la presencia de cualquier tipo de fibras en los puentes, mostró la presencia de grupos neuríticos en la matriz extracelular de los individuos control y en la matriz fibroso-celular presente en torno a los puentes. La presencia de fibras en los controles se puede explicar por el tipo de material componente de la matriz formada. Así, sabemos que tras una lesión medular experimental son típicos el sangrado y el edema postquirúrgico (Mihai et al., 2008), lo que sugiere que la composición más probable de la matriz control sea la de coágulos de fibrina, especialmente tras observar fibras rojas marcadas con la tinción tricrómica de Mallory, un marcaje típico de estas fibras. Si, además tenemos en cuenta que la fibrina es un excelente material para promover el crecimiento neurítico (Herbert et al., 1998; Dubey et al., 2001; Taylor et al., 2004), es razonable la presencia de fibras neuríticas en el interior de las matrices. En los

individuos con puente, únicamente se observó crecimiento neurítico en la matriz fibroso-celular indicada anteriormente y a través las fisuras generadas en los puentes, indicando la imposibilidad de las neuritas de crecer a través de los poros del material. Este comportamiento fue probablemente consecuencia de la baja porosidad del material, que no superó el mínimo del 50% necesario para obtener respuestas tisulares adecuadas (Woerly et al., 1991), o a la baja interconectividad de los poros, descrita como la causa de respuestas de crecimiento limitadas por parte de las neuritas (Patist et al., 2004). Por tanto, y como la mezcla de *quitosano* + *gelatina* es particularmente eficaz cuando se utiliza como superficie de crecimiento bidimensional, proponemos para estudios futuros la construcción superficies bidimensionales, por ejemplo canales huecos, en el interior de una matriz tridimensional que conformaría el puente. Estas observaciones están de acuerdo con trabajos donde se proponen las superficies bidimensionales como sustratos de crecimiento óptimos en el interior de superficies tridimensionales (Bellamkonda, 2006). Donde sí se observó un crecimiento acusado de neuritas fue en la *radc* tanto de individuos control como de los implantados, probablemente a causa de la gran abundancia de moléculas de matriz extracelular como el colágeno, promotoras de la invasión y crecimiento neuríticos. El marcador para Neurofilamentos mostró, además, la gran heterogeneidad en cuanto a la cantidad y distribución de las fibras entre los distintos individuos, probablemente porque los movimientos de los animales indujeron la fragmentación de los puentes a distintos niveles, permitiendo en unos casos mayor penetrabilidad neurítica que en otros. Esta enorme variabilidad impidió cuantificar el número de fibras por regiones en los distintos individuos.

El estudio realizado para comprobar la procedencia de estas fibras, mediante el seguimiento de su trayectoria, dio lugar a observar que su origen más probable es en colaterales de fibras sensoriales de las raíces dorsales vecinas. Con el fin de probar esta hipótesis, realizamos marcajes típicos de estas fibras, que permitan asegurar la procedencia de las raíces. Las fibras de las raíces se originan en neuronas de los GRD y uno de los tipos neuronales más abundantes son las neuronas sensoriales nociceptivas, que expresan el péptido CGRP (Hildebrand et al., 1997). Está descrito que las fibras de estas neuronas, de tipo amielínico, presentan procesos de colateralización tras lesiones, llegando a alcanzar hasta 5 segmentos medulares más allá de la zona de lesión (Traub et al., 1989; Belyantseva and Lewin, 1999), incluso en transecciones medulares (Zinck et al., 2007). El marcaje para este péptido permitió observar la generación de esas colaterales

CGRP-positivas similares a las encontradas por los autores previamente mencionados, desde raíces dorsales vecinas hacia el segmento medular transectado, invadiendo la *radc* y los puentes. Sin embargo, el tipo de metodología empleada no permitió determinar los segmentos medulares desde los que se produjo la emisión de colaterales. Otras fibras presentes en los GRD y susceptibles de emitir colaterales fueron las fibras mielínicas propioceptivas que expresan la proteína NF200 (Ishikawa et al., 2005). En este trabajo presentamos las primeras evidencias de que esas fibras son capaces de emitir colaterales tras una lesión medular, llegando a invadir los puentes y, principalmente, la *radc*.

Hacemos notar que el crecimiento de todos estos tipos neuríticos ocurrió únicamente en las regiones de los puentes en que estaban presentes células y moléculas de la matriz extracelular, reforzando la hipótesis de que los puentes contruidos con estos materiales deben poseer superficies bidimensionales que promuevan la invasión y colonización de células secretoras de matriz extracelular y que ayuden al crecimiento y elongación de neuritas y axones. Uno de los tipos celulares que presenta mayor interés para colonizar los puentes son las CS. Estas células son promotoras de la regeneración axonal y se sabe que tienen la capacidad de invadir lesiones medulares a partir de raíces periféricas vecinas, llegando incluso a remielinizar los axones dañados (Bresnahan, 1978; Blight and Young, 1989; Beattie et al., 1997; Salgado-Ceballos et al., 1998). Por esta razón, su presencia en la zona de lesión resultó de vital importancia, ya que constituyen mecanismos reparadores intrínsecos en la zona. En este trabajo comprobamos la presencia de estas células en los puentes mediante los marcadores GFAP y p75 específicos para CS con fenotipo no mielinizante (Jessen and Mirsky, 1984; Jessen et al., 1990), observándose su presencia de abundante en la *radc*, y de manera más aislada en la matriz que rodeó a los puentes implantados. En muchas ocasiones encontramos estas células estrechamente asociadas a neuritas, tal vez ayudándolas en su crecimiento, de manera similar a lo descrito para los procesos de colateralización de nervios periféricos (Xu et al., 2008). Teniendo en cuenta la gran importancia de las CS en las lesiones medulares, proponemos en el futuro estudiar la adhesión y proliferación de estas células sobre superficies de *quitosano + gelatina* para examinar si esta mezcla promueve las mismas respuestas que las observadas en este estudio para las células de GEBO, intentando así mejorar las respuestas adhesivas descritas hasta la fecha sobre superficies de quitosano (Soria et al., 2007).

Aunque intentamos identificar a los tipos celulares presentes en los puentes o en torno a ellos, únicamente observamos la presencia de algunas células inmunitarias tipos macrófago y linfocitos, indicando la existencia de respuesta inflamatoria discreta hacia los puentes, similar a la descrita para tubos de quitosano implantados en lesiones periféricas (Rosales-Cortes et al., 2003) aunque no se observó sintomatología en ninguno de los animales indicativa de rechazo inmunitario. También observamos algunas células fusiformes, que expresaban el proteoglicano NG2 y presentaron una distribución muy heterogénea entre individuos. Estas células, probablemente, representan subpoblaciones de CS o precursores gliales (McTigue et al., 2001; Zai and Wrathall, 2005). El resto de células, marcadas con el colorante nuclear Hoechst, pero negativas para los marcadores inmunitarios utilizados, se asociaron principalmente a fibroblastos u otros tipos celulares secretores de grandes cantidades de moléculas de matriz extracelular, principalmente colágeno.

Finalmente, destacamos dos aspectos importantes observados en este estudio. El primero de ellos fue la resistencia de los puentes a la degradación, permaneciendo prácticamente intactos tras 2 meses de implante *in vivo*, sufriendo únicamente un proceso de fragmentación inducido, probablemente, por los movimientos de los animales. Este tiempo supera en gran medida los tiempos descritos para otro tipo de tubos construidos con quitosano, donde el material sufrió una degradación importante a las 4 semanas de su implante (Itoh et al., 2003). El segundo aspecto notable observado fue el aumento de movimientos de los miembros posteriores en el grupo experimental con puente y transplante de células de GEBO. Este aumento en la motilidad se asoció siempre a movimientos reflejos desencadenantes de espasticidad. Como han descrito otros investigadores de los movimientos espásticos (Burchiel and Hsu, 2001; Dietz and Sinkjaer, 2007), este aumento de la motilidad podría deberse a que las células de GEBO indujeran la inactivación de las interneuronas medulares que controlan la actividad de las motoneuronas, perdiendo éstas el control al que estaban sometidas y produciéndose un aumento en la frecuencia y duración de los estímulos espontáneos desencadenados por estas células y traducidos en un aumento de las descargas reflejas, que llevan a estados de hipertonía muscular. Esta hipótesis, sin embargo, no se comprobó en este trabajo y requiere experimentación futura específica.

En conclusión, el implante de puentes artificiales contruidos con quitosano y gelatina constituye una estrategia prometedora para reparar lesiones medulares, aunque los estudios llevados a cabo en este trabajo sugieren la necesidad de construir con ellos superficies de crecimiento bidimensionales.

6. CONCLUSIONES

1. Los geles preparados a partir de soluciones de quitosano al 1 y 2% presentan una morfología similar, aunque la consistencia de los preparados al 2% fue superior, permitiendo una manipulación más adecuada para construir puentes.
2. Las superficies de crecimiento de quitosano al 2% fueron más promotoras de la adhesión y proliferación que las preparadas al 1%.
3. El aumento en la concentración de quitosano indujo cambios en sus propiedades adhesivas y neuritogénicas para células PC12, cuando se mezcla con gelatina y poli-L-lisina (PLL), con respecto al quitosano al 1%. En este caso las relaciones en peso óptimas para mezclar el quitosano fueron de 0.4 para gelatina y de 0.01 para PLL.
4. La modificación del quitosano mediante su mezcla con gelatina y PLL en relaciones en peso de 0.4 y 0.01 respectivamente, indujeron modificaciones químicas en las mezclas, originadas en interacciones de tipo electrostático y traducidas, en el caso de la mezcla de *quitosano + gelatina*, en la formación de una estructura más compacta y térmicamente estable.
5. Los estudios de adhesión con cultivos primarios de células neurales mostraron la preferencia de las neuronas por las superficies con PLL, mientras que las células gliales (astrocitos y GEBO) prefirieron la mezcla de *quitosano + gelatina*, que promovió su proliferación.
6. La mezcla de *quitosano + gelatina* promovió fuertemente la emisión y elongación de las neuritas por ganglios de la raíz dorsal, haciendo de la mezcla el candidato ideal para la construcción de puentes.
7. Los puentes contruidos con la mezcla de *quitosano + gelatina* e implantados transecciones medulares, se unieron bien al tejido medular de los muñones, permitiendo la invasión de neuritas periféricas y células de Schwann en una matriz fibroso-celular generada en torno a los puentes. Sin embargo, no promovieron regeneración axonal central a través de ellos, traducido en una ausencia de recuperación funcional.

8. Los puentes de *quitosano* + *gelatina* no permitieron el paso de células ni neuritas a través de sus poros, quedando éstas retenidas en las fisuras y regiones de más fácil acceso a las células.
9. La terapia con células de GEBO no promovió la regeneración axonal central a través de la cicatriz glial, aunque actuó indirectamente sobre la actividad de las motoneuronas espinales induciendo un aumento de la espasticidad en estos animales.

CONCLUSIÓN GENERAL:

La construcción de puentes para su implante en lesiones medulares requiere de toda una serie de experimentación previa que garantice la idoneidad del material a implantar en el SNC. En base a los resultados obtenidos con los puentes de *quitosano* + *gelatina* son un material con excelentes propiedades adhesivas y neuritogénicas, pero su estructura tridimensional no favorece el paso de células y neuritas a través de sus poros. Es necesaria la construcción de canales que garanticen estructuras con superficies de crecimiento bidimensionales.

7.BIBLIOGRAFÍA

- Aebischer P, Guenard V, Valentini RF (1990) The morphology of regenerating peripheral nerves is modulated by the surface microgeometry of polymeric guidance channels. *Brain Res* 531:211-218.
- Aguayo AJ, David S, Bray GM (1981) Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents. *J Exp Biol* 95:231-240.
- Aguiar CB, Lobao-Soares B, varez-Silva M, Trentin AG (2005) Glycosaminoglycans modulate C6 glioma cell adhesion to extracellular matrix components and alter cell proliferation and cell migration. *BMC Cell Biol* 6:31.
- Ahmed Z, Brown RA (1999) Adhesion, alignment, and migration of cultured Schwann cells on ultrathin fibronectin fibres. *Cell Motil Cytoskeleton* 42:331-343.
- Akassoglou K, Akpinar P, Murray S, Strickland S (2003) Fibrin is a regulator of Schwann cell migration after sciatic nerve injury in mice. *Neurosci Lett* 338:185-188.
- Akassoglou K, Yu WM, Akpinar P, Strickland S (2002) Fibrin inhibits peripheral nerve remyelination by regulating Schwann cell differentiation. *Neuron* 33:861-875.
- Akeson R, Warren SL (1986) PC12 adhesion and neurite formation on selected substrates are inhibited by some glycosaminoglycans and a fibronectin-derived tetrapeptide. *Exp Cell Res* 162:347-362.
- Altankov G, Grinnell F, Groth T (1996) Studies on the biocompatibility of materials: fibroblast reorganization of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability. *J Biomed Mater Res* 30:385-391.
- Andrews MR, Stelzner DJ (2004) Modification of the regenerative response of dorsal column axons by olfactory ensheathing cells or peripheral axotomy in adult rat. *Exp Neurol* 190:311-327.
- Anthes DL, Theriault E, Tator CH (1996) Ultrastructural evidence for arteriolar vasospasm after spinal cord trauma. *Neurosurgery* 39:804-814.
- Anthonsen MW, Varum KM, Smidsrod O (1993) Solution properties of chitosan: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation. *Carbohydr Res* 22:193.
- ASIA (American Spinal Injury Association) (2000) International Standards for Neurological Classification of SCI. Chicago: American Spinal Injury Association.
- Assouline JG, Pantazis NJ (1989) Detection of a nerve growth factor receptor on fetal human Schwann cells in culture: absence of the receptor on fetal human astrocytes. *Brain Res Dev Brain Res* 45:1-14.
- Babic M, Horák D, Trchová M, Jendelová P, Glogarová K, Herynek V, Hájek M, Syková E (2008) Poly(L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjug Chem* 19:740-750.
- Back JF, Oakenfull D, Smith MB (1979) Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry* 18:5191-5196.
- Bailey SB, Eichler ME, Villadiego A, Rich KM (1993) The influence of fibronectin and laminin during Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration through silicon chambers. *J Neurocytol* 22:176-184.

- Balgude AP, Yu X, Szymanski A, Bellamkonda RV (2001) Agarose gel stiffness determines rate of DRG neurite extension in 3D cultures. *Biomaterials* 22:1077-1084.
- Bareyre FM, Schwab ME (2003) Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. *Trends Neurosci* 26:555-563.
- Barnard JW, Carpenter A (1950) Lack of regeneration in the spinal cord of the rat. *J Neurophysiol* 13:223-228.
- Barnett SC, Riddell JS (2007) Olfactory ensheathing cell transplantation as a strategy for spinal cord repair--what can it achieve? *Nat Clin Pract Neurol* 3:152-161.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12:1-21.
- Battiston B, Tos P, Cushway TR, Geuna S (2000) Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts I. Clinical results. *Microsurgery* 20:32-36.
- bdel-Fattah WI, Jiang T, El-Bassyouni G, Laurencin CT (2007) Synthesis, characterization of chitosans and fabrication of sintered chitosan microsphere matrices for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 3:503-514.
- Beattie MS, Bresnahan JC, Komon J, Tovar CA, Van MM, Anderson DK, Faden AI, Hsu CY, Noble LJ, Salzman S, Young W (1997) Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat. *Exp Neurol* 148:453-463.
- Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC (2000) Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 17:915-925.
- Bellamkonda R, Ranieri JP, Bouche N, Aebischer P (1995) Hydrogel-based three-dimensional matrix for neural cells. *J Biomed Mater Res* 29:663-671.
- Bellamkonda RV (2006) Peripheral nerve regeneration: an opinion on channels, scaffolds and anisotropy. *Biomaterials* 27:3515-3518.
- Belyantseva IA, Lewin GR (1999) Stability and plasticity of primary afferent projections following nerve regeneration and central degeneration. *Eur J Neurosci* 11:457-468.
- Berezovskaya OL, Mares V, Skibo GG (1995) Growth related changes in sugar determinants on the surface of C6 glioma cells in culture: a cytochemical lectin-binding study. *J Neurosci Res* 42:192-198.
- Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R (2004) Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm* 57:19-34.
- Bessea L, Coulomb B, Lebreton-Decoster C, Giraud-Guille MM (2002) Production of ordered collagen matrices for three-dimensional cell culture. *Biomaterials* 23:27-36.
- Bini TB, Gao S, Xu X, Wang S, Ramakrishna S, Leong KW (2004) Peripheral nerve regeneration by microbraided poly(L-lactide-co-glycolide) biodegradable polymer fibers. *J Biomed Mater Res A* 68:286-295.
- Blight AR, Young W (1989) Central axons in injured cat spinal cord recover electrophysiological function following remyelination by Schwann cells. *J Neurol Sci* 91:15-34.

- Borgens RB, Blight AR, McGinnis ME (1987) Behavioral recovery induced by applied electric fields after spinal cord hemisection in guinea pig. *Science* 238:366-369.
- Borgens RB, Shi R, Bohnert D (2002) Behavioral recovery from spinal cord injury following delayed application of polyethylene glycol. *J Exp Biol* 205:1-12.
- Borkenhagen M, Clemence JF, Sigrist H, Aebischer P (1998) Three-dimensional extracellular matrix engineering in the nervous system. *J Biomed Mater Res* 40:392-400.
- Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416:636-640.
- Brandt J, Dahlin LB, Lundborg G (1999) Autologous tendons used as grafts for bridging peripheral nerve defects. *J Hand Surg [Br]* 24:284-290.
- Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, Dai HN, Gao D, Schwab ME (1995) Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* 378:498-501.
- Bresnahan JC (1978) An electron-microscopic analysis of axonal alterations following blunt contusion of the spinal cord of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Neurol Sci* 37:59-82.
- Brown JO, McCough GP (1947) Abortive regeneration of the transected spinal cord. *J Comp Neurol* 87:131-137.
- Brown RE, Erdmann D, Lyons SF, Suchy H (1996) The use of cultured Schwann cells in nerve repair in a rabbit hind-limb model. *J Reconstr Microsurg* 12:149-152.
- Brunauer S, Deming LS, Deming E, Teller E (1940) On a theory of the van der Waals adsorption of gases. *J Am Chem Soc* 62:1723-1732.
- Brunauer S, Emmett PH, Teller E (1938) Adsorption of gases in multimolecular layers. *J Am Chem Soc* 60:309-319.
- Bu J, Akhtar N, Nishiyama A (2001) Transient expression of the NG2 proteoglycan by a subpopulation of activated macrophages in an excitotoxic hippocampal lesion. *Glia* 34:296-310.
- Bunge RP (1993) Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 3:805-809.
- Burchiel KJ, Hsu FP (2001) Pain and spasticity after spinal cord injury: mechanisms and treatment. *Spine* 26:S146-S160.
- Cael JJ, Koenig JL, Blackwell J (1974) Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates. Part IV: identification of configuration- and conformation- sensitive modes for D-glucose by normal coordinate analysis. *Carbohydr Res* 32:79-91.
- Canalón PF (1987) Survival and subsequent regeneration of olfactory neurons after a distal axonal lesion. *J Neurocytol* 16:829-841.
- Cao QL, Zhang YP, Howard RM, Walters WM, Tsoulfas P, Whittemore SR (2001) Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. *Exp Neurol* 167:48-58.

- Cao W, Cheng M, Ao Q, Gong Y, Zhao N, Zhang X (2005) Physical, mechanical and degradation properties, and schwann cell affinity of cross-linked chitosan films. *J Biomater Sci Polym Ed* 16:791-807.
- Carey DJ, Todd MS, Rafferty CM (1986) Schwann cell myelination: induction by exogenous basement membrane-like extracellular matrix. *J Cell Biol* 102:2254-2263.
- Carlstedt T, Cullheim S, Risling M, Ulfhake B (1989) Nerve fibre regeneration across the PNS-CNS interface at the root-spinal cord junction. *Brain Res Bull* 22:93-102.
- Ceballos D, Navarro X, Dubey N, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR, Tranquillo RT (1999) Magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide improves peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 158:290-300.
- Chamberlain LJ, Yannas IV, Hsu HP, Strichartz G, Spector M (1998) Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through collagen tubes up to level of autograft. *Exp Neurol* 154:315-329.
- Chau KL, Porter DM (1991) Surface isoelectric point of evaporated silver films: determination by contact angle titration. *J Colloid Interface Sci* 145:283-286.
- Chen YS, Chang JY, Cheng CY, Tsai FJ, Yao CH, Liu BS (2005) An in vivo evaluation of a biodegradable genipin-cross-linked gelatin peripheral nerve guide conduit material. *Biomaterials* 26:3911-3918.
- Chen YS, Hsieh CL, Tsai CC, Chen TH, Cheng WC, Hu CL, Yao CH (2000) Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials* 21:1541-1547.
- Chen ZY, Chai YF, Cao L, Lu CL, He C (2001) Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances axonal regeneration following sciatic nerve transection in adult rats. *Brain Res* 902:272-276.
- Cheng H, Cao Y, Olson L (1996) Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science* 273:510-513.
- Cheng H, Olson L (1995) A new surgical technique that allows proximodistal regeneration of 5-HT fibers after complete transection of the rat spinal cord. *Exp Neurol* 136:149-161.
- Cheng M, Cao W, Gao Y, Gong Y, Zhao N, Zhang X (2003a) Studies on nerve cell affinity of biodegradable modified chitosan films. *J Biomater Sci Polym Ed* 14:1155-1167.
- Cheng M, Deng J, Yang F, Gong Y, Zhao N, Zhang X (2003b) Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. *Biomaterials* 24:2871-2880.
- Chenite A, Chaput C, Wang D, Combes C, Buschmann MD, Hoemann CD, Leroux JC, Atkinson BL, Binette F, Selmani A (2000) Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials* 21:2155-2161.
- Choi BH, Zhu SJ, Kim SH, Kim BY, Huh JH, Lee SH, Jung JH (2005) Nerve repair using a vein graft filled with collagen gel. *J Reconstr Microsurg* 21:267-272.
- Chopra S, Mahdi S, Kaur J, Iqbal Z, Talegaonkar S, Ahmad FJ (2006) Advances and potential applications of chitosan derivatives as mucoadhesive biomaterials in modern drug delivery. *J Pharm Pharmacol* 58:1021-1032.

- Chow SY, Moul J, Tobias CA, Himes BT, Liu Y, Obrocka M, Hodge L, Tessler A, Fischer I (2000) Characterization and intraspinal grafting of EGF/bFGF-dependent neurospheres derived from embryonic rat spinal cord. *Brain Res* 874:87-106.
- Chuah MI, Au C (1993) Cultures of ensheathing cells from neonatal rat olfactory bulbs. *Brain Res* 601:213-220.
- Chuang WY, Young TH, Yao CH, Chiu WY (1999) Properties of the poly(vinyl alcohol)/chitosan blend and its effect on the culture of fibroblast in vitro. *Biomaterials* 20:1479-1487.
- Ciardelli G, Chiono V (2006) Materials for peripheral nerve regeneration. *Macromol Biosci* 6:13-26.
- Colin W, Donoff RB (1984) Nerve regeneration through collagen tubes. *J Dent Res* 63:987-993.
- Collazos-Castro JE, Muneton-Gomez VC, Nieto-Sampedro M (2005) Olfactory glia transplantation into cervical spinal cord contusion injuries. *J Neurosurg Spine* 3:308-317.
- Crompton KE, Goud JD, Bellamkonda RV, Gengenbach TR, Finkelstein DI, Horne MK, Forsythe JS (2007) Polylysine-functionalised thermoresponsive chitosan hydrogel for neural tissue engineering. *Biomaterials* 28:441-449.
- Curt A, Schwab ME, Dietz V (2004) Providing the clinical basis for new interventional therapies: refined diagnosis and assessment of recovery after spinal cord injury. *Spinal Cord* 42:1-6.
- Curtis AS, Forrester JV, McInnes C, Lawrie F (1983) Adhesion of cells to polystyrene surfaces. *J Cell Biol* 97:1500-1506.
- Dalton PD, Flynn L, Shoichet MS (2002) Manufacture of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) hydrogel tubes for use as nerve guidance channels. *Biomaterials* 23:3843-3851.
- Dang JM, Leong KW (2006) Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 58:487-499.
- David S, Aguayo AJ (1981) Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214:931-933.
- Davis GE, Blaker SN, Engvall E, Varon S, Manthorpe M, Gage FH (1987) Human amnion membrane serves as a substratum for growing axons in vitro and in vivo. *Science* 236:1106-1109.
- de la Torre JC (1982) Catecholamine fiber regeneration across a collagen bioimplant after spinal cord transection. *Brain Res Bull* 9:545-552.
- Deller T, Haas CA, Freiman TM, Phinney A, Jucker M, Frotscher M (2006) Lesion-induced axonal sprouting in the central nervous system. *Adv Exp Med Biol* 557:101-121.
- den Dunnen WF, Meek MF, Grijpma DW, Robinson PH, Schakenraad JM (2000) In vivo and in vitro degradation of poly[(50)/(50) ((85)/(15)(L)/(D))LA/epsilon-CL], and the implications for the use in nerve reconstruction. *J Biomed Mater Res* 51:575-585.
- Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ (2001) In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 282:148-152.

- Denuziere A, Ferrier D, Domard A (2000) Interactions between chitosan and glycosaminoglycans (chondroitin sulfate and hyaluronic acid): physicochemical and biological studies. *Ann Pharm Fr* 58:47-53.
- Deumens R, Koopmans GC, Honig WM, Maquet V, Jerome R, Steinbusch HW, Joosten EA (2006) Limitations in transplantation of astroglia-biomatrix bridges to stimulate corticospinal axon regrowth across large spinal lesion gaps. *Neurosci Lett* 400:208-212.
- Deumens R, Koopmans GC, Honig WM, Hamers FP, Maquet V, Jerome R, Steinbusch HW, Joosten EA (2006a) Olfactory ensheathing cells, olfactory nerve fibroblasts and biomatrices to promote long-distance axon regrowth and functional recovery in the dorsally hemisected adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 200:89-103.
- Deumens R, Koopmans GC, Honig WM, Maquet V, Jerome R, Steinbusch HW, Joosten EA (2006b) Chronically injured corticospinal axons do not cross large spinal lesion gaps after a multifactorial transplantation strategy using olfactory ensheathing cell/olfactory nerve fibroblast-biomatrix bridges. *J Neurosci Res* 83:811-820.
- Deumens R, Koopmans GC, Joosten EA (2005) Regeneration of descending axon tracts after spinal cord injury. *Prog Neurobiol* 77:57-89.
- Devon R, Doucette R (1992) Olfactory ensheathing cells myelinate dorsal root ganglion neurites. *Brain Res* 589:175-179.
- Dietz V, Sinkjaer T (2007) Spastic movement disorder: impaired reflex function and altered muscle mechanics. *Lancet Neurol* 6:725-733.
- Dillon GP, Yu X, Bellamkonda RV (2000) The polarity and magnitude of ambient charge influences three-dimensional neurite extension from DRGs. *J Biomed Mater Res* 51:510-519.
- Dillon GP, Yu X, Sridharan A, Ranieri JP, Bellamkonda RV (1998) The influence of physical structure and charge on neurite extension in a 3D hydrogel scaffold. *J Biomater Sci Polym Ed* 9:1049-1069.
- Dodla MC, Bellamkonda RV (2006) Anisotropic scaffolds facilitate enhanced neurite extension in vitro. *J Biomed Mater Res A* 78:213-221.
- Donaldson J, Shi R, Borgens R (2002) Polyethylene glycol rapidly restores physiological functions in damaged sciatic nerves of guinea pigs. *Neurosurgery* 50:147-156.
- Dong Z, Brennan A, Liu N, Yarden Y, Lefkowitz G, Mirsky R, Jessen KR (1995) Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron* 15:585-596.
- Doucette JR (1984) The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb. *Anat Rec* 210:385-391.
- Doucette R (1993) Glial cells in the nerve fiber layer of the main olfactory bulb of embryonic and adult mammals. *Microsc Res Tech* 24:113-130.
- Doucette JR, Kiernan JA, Flumerfelt BA (1983) The re-innervation of olfactory glomeruli following transection of primary olfactory axons in the central or peripheral nervous system. *J Anat* 137 (Pt 1):1-19.
- Doucette R (1990) Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia* 3:433-449.

- Dubey N, Letourneau PC, Tranquillo RT (1999) Guided neurite elongation and schwann cell invasion into magnetically aligned collagen in simulated peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 158:338-350.
- Dubey N, Letourneau PC, Tranquillo RT (2001) Neuronal contact guidance in magnetically aligned fibrin gels: effect of variation in gel mechano-structural properties. *Biomaterials* 22:1065-1075.
- Duerstock BS, Borgens RB (2002) Three-dimensional morphometry of spinal cord injury following polyethylene glycol treatment. *J Exp Biol* 205:13-24.
- Eglitis MA, Mezey E (1997) Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4080-4085.
- EHRMANN RL, GEY GO (1956) The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat-tail collagen. *J Natl Cancer Inst* 16:1375-1403.
- Elsdale T, Bard J (1972) Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol* 54:626-637.
- Evans GR, Brandt K, Katz S, Chauvin P, Otto L, Bogle M, Wang B, Meszlenyi RK, Lu L, Mikos AG, Patrick CW, Jr. (2002) Bioactive poly(L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 23:841-848.
- Evans GR, Brandt K, Niederbichler AD, Chauvin P, Herrman S, Bogle M, Otta L, Wang B, Patrick CW, Jr. (2000) Clinical long-term in vivo evaluation of poly(L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed* 11:869-878.
- Evans JR, Davids WG, MacRae JD, Amirbahman A (2002) Kinetics of cadmium uptake by chitosan-based crab shells. *Water Res* 36:3219-3226.
- Facchiano F, Fernandez E, Mancarella S, Maira G, Miscusi M, D'Arcangelo D, Cimino-Reale G, Falchetti ML, Capogrossi MC, Pallini R (2002) Promotion of regeneration of corticospinal tract axons in rats with recombinant vascular endothelial growth factor alone and combined with adenovirus coding for this factor. *J Neurosurg* 97:161-168.
- Faden AI, Simon RP (1988) A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann Neurol* 23:623-626.
- Fairless R, Barnett SC (2005) Olfactory ensheathing cells: their role in central nervous system repair. *Int J Biochem Cell Biol* 37:693-699.
- Fan W, Gu J, Hu W, Deng A, Ma Y, Liu J, Ding F, Gu X (2008) Repairing a 35-mm-long median nerve defect with a chitosan/PGA artificial nerve graft in the human: a case study. *Microsurgery* 28:238-242.
- Fang N, Chan V, Mao HQ, Leong KW (2001) Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH. *Biomacromolecules* 2:1161-1168.
- Farooqui AA, Horrocks LA (1998) Lipid peroxides in the free radical pathophysiology of brain diseases. *Cell Mol Neurobiol* 18:599-608.
- Favaro G, Bortolami MC, Cereser S, Dona M, Pastorello A, Callegaro L, Fiori MG (1990) Peripheral nerve regeneration through a novel bioresorbable nerve guide. *ASAIO Trans* 36:M291-M294.

- Fawcett JW, Asher RA (1999) The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 49:377-391.
- Feigin I, Geller EH, Wolf G (1951) Absence of regeneration in the spinal cord of the young rat. *J Neuropathol Exp Neurol* 10:420-425.
- Fernandes KJ, Fan DP, Tsui BJ, Cassar SL, Tetzlaff W (1999) Influence of the axotomy to cell body distance in rat rubrospinal and spinal motoneurons: differential regulation of GAP-43, tubulins, and neurofilament-M. *J Comp Neurol* 414:495-510.
- Flanagan LA, Ju YE, Marg B, Osterfield M, Janmey PA (2002) Neurite branching on deformable substrates. *Neuroreport* 13:2411-2415.
- Flynn L, Dalton PD, Shoichet MS (2003) Fiber templating of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) for neural tissue engineering. *Biomaterials* 24:4265-4272.
- Focher B, Naggi A, Torri G, Cosani A, Terbojevich M (1992) Chitosans from *Euphausia superba*. 2: Characterization of solid state structure. *Carbohydr Polym* 18:43-49.
- Fouad K, Schnell L, Bunge MB, Schwab ME, Liebscher T, Pearse DD (2005) Combining Schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord. *J Neurosci* 25:1169-1178.
- Fraidakis MJ, Spenger C, Olson L (2004) Partial recovery after treatment of chronic paraplegia in rat. *Exp Neurol* 188:33-42.
- Franich RA, Goodin SJ (1984) Acetamidofurans, acetamidopyrones, and acetamidoacetaldehyde from pyrolysis of chitin and N-acetylglucosamine. *J Anal Appl Pyrol* 7:91-100.
- Franklin RJ, Gilson JM, Franceschini IA, Barnett SC (1996) Schwann cell-like myelination following transplantation of an olfactory bulb-ensheathing cell line into areas of demyelination in the adult CNS. *Glia* 17:217-224.
- Franssen EH, de Bree FM, Verhaagen J (2007) Olfactory ensheathing glia: their contribution to primary olfactory nervous system regeneration and their regenerative potential following transplantation into the injured spinal cord. *Brain Res Rev* 56:236-258.
- Freier T, Koh HS, Kazazian K, Shoichet MS (2005) Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. *Biomaterials* 26:5872-5878.
- Freier T, Montenegro R, Shan KH, Shoichet MS (2005) Chitin-based tubes for tissue engineering in the nervous system. *Biomaterials* 26:4624-4632.
- Frushour BG, Koenig JL (1975) Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin. *Biopolymers* 14:379-391.
- Gai WP, Zhou XF, Rush RA (1996) Analysis of low affinity neurotrophin receptor (p75) expression in glia of the CNS-PNS transition zone following dorsal root transection. *Neuropathol Appl Neurobiol* 22:434-439.
- Garcia-Alias G, Lopez-Vales R, Fores J, Navarro X, Verdu E (2004) Acute transplantation of olfactory ensheathing cells or Schwann cells promotes recovery after spinal cord injury in the rat. *J Neurosci Res* 75:632-641.
- Geller HM, Fawcett JW (2002) Building a bridge: engineering spinal cord repair. *Exp Neurol* 174:125-136.

- Gelse K, Poschl E, Aigner T (2003) Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55:1531-1546.
- Gerecht-Nir S, Cohen S, Ziskind A, Itskovitz-Eldor J (2004) Three-dimensional porous alginate scaffolds provide a conducive environment for generation of well-vascularized embryoid bodies from human embryonic stem cells. *Biotechnol Bioeng* 88:313-320.
- Giannetti S, Lauretti L, Fernandez E, Salvinelli F, Tamburrini G, Pallini R (2001) Acrylic hydrogel implants after spinal cord lesion in the adult rat. *Neurol Res* 23:405-409.
- Gibson SJ, Polak JM, Bloom SR, Sabate IM, Mulderry PM, Ghatel MA, McGregor GP, Morrison JF, Kelly JS, Evans RM, . (1984) Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. *J Neurosci* 4:3101-3111.
- Gingras M, Paradis I, Berthod F (2003) Nerve regeneration in a collagen-chitosan tissue-engineered skin transplanted on nude mice. *Biomaterials* 24:1653-1661.
- Gogolewski S, Jovanovic M, Perren SM, Dillon JG, Hughes MK (1993) Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA). *J Biomed Mater Res* 27:1135-1148.
- Goldberg JL, Klassen MP, Hua Y, Barres BA (2002) Amacrine-signaled loss of intrinsic axon growth ability by retinal ganglion cells. *Science* 296:1860-1864.
- Gomez VM, Averill S, King V, Yang Q, Perez ED, Chacon SC, Ward R, Nieto-Sampedro M, Priestley J, Taylor J (2003) Transplantation of olfactory ensheathing cells fails to promote significant axonal regeneration from dorsal roots into the rat cervical cord. *J Neurocytol* 32:53-70.
- Gong Y, He L, Li J, Zhou Q, Ma Z, Gao C, Shen J (2007) Hydrogel-filled polylactide porous scaffolds for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 82:192-204.
- Grinnell F, Feld MK (1982) Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. *J Biol Chem* 257:4888-4893.
- Gudino-Cabrera G, Nieto-Sampedro M (1996) Ensheathing cells: Large scale purification from adult olfactory bulb, freeze-preservation and migration of transplanted cells in adult brain. *Restor Neurol Neurosci* 10:25-34.
- Gudino-Cabrera G, Pastor AM, de la Cruz RR, gado-Garcia JM, Nieto-Sampedro M (2000) Limits to the capacity of transplants of olfactory glia to promote axonal regrowth in the CNS. *Neuroreport* 11:467-471.
- Guest JD, Hesse D, Schnell L, Schwab ME, Bunge MB, Bunge RP (1997a) Influence of IN-1 antibody and acidic FGF-fibrin glue on the response of injured corticospinal tract axons to human Schwann cell grafts. *J Neurosci Res* 50:888-905.
- Guest JD, Rao A, Olson L, Bunge MB, Bunge RP (1997b) The ability of human Schwann cell grafts to promote regeneration in the transected nude rat spinal cord. *Exp Neurol* 148:502-522.
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, . (1988) Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96:379-394.

- Hadlock T, Sundback C, Hunter D, Cheney M, Vacanti JP (2000) A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng* 6:119-127.
- Hadlock TA, Sundback CA, Hunter DA, Vacanti JP, Cheney ML (2001) A new artificial nerve graft containing rolled Schwann cell monolayers. *Microsurgery* 21:96-101.
- Hagg T (2006) Collateral sprouting as a target for improved function after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 23:281-294.
- Haipeng G, Yinghui Z, Jianchun L, Yandao G, Nanming Z, Xiufang Z (2000) Studies on nerve cell affinity of chitosan-derived materials. *J Biomed Mater Res* 52:285-295.
- Hall H, Baechi T, Hubbell JA (2001) Molecular properties of fibrin-based matrices for promotion of angiogenesis in vitro. *Microvasc Res* 62:315-326.
- Hamano T, Chiba D, Teramoto A, Kondo Y, Abe K (1998) Effect of polyelectrolyte complex (PEC) on human periodontal ligament fibroblast (HPLF) functions in the presence of glucocorticoids. *J Biomater Sci Polym Ed* 9:985-1000.
- Hardy JJ, Carrell NA, McDonagh J (1983) Calcium ion functions in fibrinogen conversion to fibrin. *Ann N Y Acad Sci* 408:279-287.
- Hashimoto T, Suzuki Y, Kitada M, Kataoka K, Wu S, Suzuki K, Endo K, Nishimura Y, Ide C (2002) Peripheral nerve regeneration through alginate gel: analysis of early outgrowth and late increase in diameter of regenerating axons. *Exp Brain Res* 146:356-368.
- Haston WS, Shields JM, Wilkinson PC (1983) The orientation of fibroblasts and neutrophils on elastic substrata. *Exp Cell Res* 146:117-126.
- Hayen W, Goebeler M, Kumar S, Riessen R, Nehls V (1999) Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture. *J Cell Sci* 112 (Pt 13):2241-2251.
- Hazari A, Johansson-Ruden G, Junemo-Bostrom K, Ljungberg C, Terenghi G, Green C, Wiberg M (1999) A new resorbable wrap-around implant as an alternative nerve repair technique. *J Hand Surg [Br]* 24:291-295.
- Heidemann SR, Buxbaum RE (1994) Mechanical tension as a regulator of axonal development. *Neurotoxicology* 15:95-107.
- Hejcl A, Urdzikova L, Sedy J, Lesny P, Pradny M, Michalek J, Burian M, Hajek M, Zamecnik J, Jendelova P, Sykova E (2008) Acute and delayed implantation of positively charged 2-hydroxyethyl methacrylate scaffolds in spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg Spine* 8:67-73.
- Herbert CB, Nagaswami C, Bittner GD, Hubbell JA, Weisel JW (1998) Effects of fibrin micromorphology on neurite growth from dorsal root ganglia cultured in three-dimensional fibrin gels. *J Biomed Mater Res* 40:551-559.
- Hernandez RB, Franco AP, Yola OR, Lopez-Delgado A, Felcman J, L. Recio MA, Mercê ALR (2008). Coordination study of chitosan and Fe³⁺. *J Molec Struc* 877:89-99.
- Hiemenz PC, Rajagopalan R (1997) Principles of Colloid and Surface Chemistry. Marcel Dekker.
- Hildebrand C, Karlsson M, Risling M (1997) Ganglionic axons in motor roots and pia mater. *Prog Neurobiol* 51:89-128.

- Horisberger M, Clerc MF (1988) Chitosan-colloidal gold complexes as polycationic probes for the detection of anionic sites by transmission and scanning electron microscopy. *Histochemistry* 90:165-175.
- Horn EM, Beaumont M, Shu XZ, Harvey A, Prestwich GD, Horn KM, Gibson AR, Preul MC, Panitch A (2007) Influence of cross-linked hyaluronic acid hydrogels on neurite outgrowth and recovery from spinal cord injury. *J Neurosurg Spine* 6:133-140.
- Huang Y, Siewe M, Madihally SV (2006) Effect of spatial architecture on cellular colonization. *Biotechnol Bioeng* 93:64-75.
- Hudry-Clergeon G, Freyssinet JM, Torbet J, Marx J (1983) Orientation of fibrin in strong magnetic fields. *Ann N Y Acad Sci* 408:380-387.
- Imaizumi T, Lankford KL, Waxman SG, Greer CA, Kocsis JD (1998) Transplanted olfactory ensheathing cells remyelinate and enhance axonal conduction in the demyelinated dorsal columns of the rat spinal cord. *J Neurosci* 18:6176-6185.
- Ikada Y (1994) Surface modification of polymers for medical applications. *Biomaterials* 15:725-736.
- Ikada Y, Tabata Y (1998) Protein release from gelatin matrices. *Adv Drug Deliv Rev* 31:287-301.
- Ishikawa T, Miyagi M, Ohtori S, Aoki Y, Ozawa T, Doya H, Saito T, Moriya H, Takahashi K (2005) Characteristics of sensory DRG neurons innervating the lumbar facet joints in rats. *Eur Spine J* 14:559-564.
- Itoh S, Yamaguchi I, Suzuki M, Ichinose S, Takakuda K, Kobayashi H, Shinomiya K, Tanaka J (2003) Hydroxyapatite-coated tendon chitosan tubes with adsorbed laminin peptides facilitate nerve regeneration in vivo. *Brain Res* 993:111-123.
- Iwakawa M, Mizoi K, Tessler A, Itoh Y (2001) Intraspinal implants of fibrin glue containing glial cell line-derived neurotrophic factor promote dorsal root regeneration into spinal cord. *Neurorehabil Neural Repair* 15:173-182.
- Iwata A, Browne KD, Pfister BJ, Gruner JA, Smith DH (2006) Long-term survival and outgrowth of mechanically engineered nervous tissue constructs implanted into spinal cord lesions. *Tissue Eng* 12:101-110.
- Iwaya K, Mizoi K, Tessler A, Itoh Y (1999) Neurotrophic agents in fibrin glue mediate adult dorsal root regeneration into spinal cord. *Neurosurgery* 44:589-595.
- JAKOBY RK, TURBES CC, FREEMAN LW (1960) The problem of neuronal regeneration in the central nervous system. I. The insertion of centrally connected peripheral nerve stumps into the spinal cord. *J Neurosurg* 17:385-393.
- Jakovcovic D, Harder DR (2007) Role of astrocytes in matching blood flow to neuronal activity. *Curr Top Dev Biol* 79:75-97.
- Jansen K, Meek MF, van der Werff JF, van Wachem PB, van Luyn MJ (2004a) Long-term regeneration of the rat sciatic nerve through a biodegradable poly(DL-lactide-epsilon-caprolactone) nerve guide: tissue reactions with focus on collagen III/IV reformation. *J Biomed Mater Res A* 69:334-341.
- Jansen K, van der Werff JF, van Wachem PB, Nicolai JP, de Leij LF, van Luyn MJ (2004b) A hyaluronan-based nerve guide: in vitro cytotoxicity, subcutaneous tissue reactions, and degradation in the rat. *Biomaterials* 25:483-489.

- Jayakumar R, Nagahama H, Furuike T, Tamura H (2008) Synthesis of phosphorylated chitosan by novel method and its characterization. *Int J Biol Macromol* 42:335-339.
- Jessen KR, Mirsky R (1985) Glial fibrillary acidic polypeptides in peripheral glia. Molecular weight, heterogeneity and distribution. *J Neuroimmunol* 8:377-393.
- Jessen KR, Mirsky R (1984) Nonmyelin-forming Schwann cells coexpress surface proteins and intermediate filaments not found in myelin-forming cells: a study of Ran-2, A5E3 antigen and glial fibrillary acidic protein. *J Neurocytol* 13:923-934.
- Jessen KR, Morgan L, Stewart HJ, Mirsky R (1990) Three markers of adult non-myelin-forming Schwann cells, 217c(Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions. *Development* 109:91-103.
- Jessen KR, Thorpe R, Mirsky R (1984) Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: an immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes. *J Neurocytol* 13:187-200.
- Johnson EM, Jr., Taniuchi M, DiStefano PS (1988) Expression and possible function of nerve growth factor receptors on Schwann cells. *Trends Neurosci* 11:299-304.
- Johnson RE, Dettre RH (1969) Wettability and Contact Angles in Surface and Colloid Science. (Matijevic E, ed), New York; Wiley.
- Jones HB, Cavanagh JB (1986) The axon reaction in spinal ganglion neurons of acrylamide-treated rats. *Acta Neuropathol (Berl)* 71:55-63.
- Kafitz KW, Greer CA (1998) The influence of ensheathing cells on olfactory receptor cell neurite outgrowth in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 855:266-269.
- Kafitz KW, Greer CA (1999) Olfactory ensheathing cells promote neurite extension from embryonic olfactory receptor cells in vitro. *Glia* 25:99-110.
- Karacaoglu E, Yuksel F, Peker F, Guler MM (2001) Nerve regeneration through an epineurial sheath: its functional aspect compared with nerve and vein grafts. *Microsurgery* 21:196-201.
- Kassar-Duchossoy L, Duchossoy Y, Rhrich-Haddout F, Horvat JC (2001) Reinnervation of a denervated skeletal muscle by spinal axons regenerating through a collagen channel directly implanted into the rat spinal cord. *Brain Res* 908:25-34.
- Kataoka K, Suzuki Y, Kitada M, Hashimoto T, Chou H, Bai H, Ohta M, Wu S, Suzuki K, Ide C (2004) Alginate enhances elongation of early regenerating axons in spinal cord of young rats. *Tissue Eng* 10:493-504.
- Kataoka K, Suzuki Y, Kitada M, Ohnishi K, Suzuki K, Tanihara M, Ide C, Endo K, Nishimura Y (2001) Alginate, a bioresorbable material derived from brown seaweed, enhances elongation of amputated axons of spinal cord in infant rats. *J Biomed Mater Res* 54:373-384.
- Kaupilla T, Jyvasjarvi E, Huopaniemi T, Hujanen E, Liesi P (1993) A laminin graft replaces neurorrhaphy in the restorative surgery of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol* 123:181-191.
- Keilhoff G, Stang F, Wolf G, Fansa H (2003) Bio-compatibility of type I/III collagen matrix for peripheral nerve reconstruction. *Biomaterials* 24:2779-2787.

- Keirstead HS, Morgan SV, Wilby MJ, Fawcett JW (1999) Enhanced axonal regeneration following combined demyelination plus schwann cell transplantation therapy in the injured adult spinal cord. *Exp Neurol* 159:225-236.
- Kim HW, Knowles JC, Kim HE (2005) Hydroxyapatite and gelatin composite foams processed via novel freeze-drying and crosslinking for use as temporary hard tissue scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 72:136-145.
- Kim IY, Seo SJ, Moon HS, Yoo MK, Park IY, Kim BC, Cho CS (2008) Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv* 26:1-21.
- Kim LS, Hong SJ, Son MK, Lee YH (2006) Polymeric and compositional properties of novel extracellular microbial polyglucosamine biopolymer from new strain of citrobacter sp. BL-4. *Biotechnol Lett* 28:241-245.
- Kim S, Nimni ME, Yang Z, Han B (2005) Chitosan/gelatin-based films crosslinked by proanthocyanidin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 75:442-450.
- King VR, Henseler M, Brown RA, Priestley JV (2003) Mats made from fibronectin support oriented growth of axons in the damaged spinal cord of the adult rat. *Exp Neurol* 182:383-398.
- King VR, Phillips JB, Hunt-Grubbe H, Brown R, Priestley JV (2006) Characterization of non-neuronal elements within fibronectin mats implanted into the damaged adult rat spinal cord. *Biomaterials* 27:485-496.
- Koda M, Hashimoto M, Murakami M, Yoshinaga K, Ikeda O, Yamazaki M, Koshizuka S, Kamada T, Moriya H, Shirasawa H, Sakao S, Ino H (2004) Adenovirus vector-mediated in vivo gene transfer of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes rubrospinal axonal regeneration and functional recovery after complete transection of the adult rat spinal cord. *J Neurotrauma* 21:329-337.
- Koda M, Kamada T, Hashimoto M, Murakami M, Shirasawa H, Sakao S, Ino H, Yoshinaga K, Koshizuka S, Moriya H, Yamazaki M (2007) Adenovirus vector-mediated ex vivo gene transfer of brain-derived neurotrophic factor to bone marrow stromal cells promotes axonal regeneration after transplantation in completely transected adult rat spinal cord. *Eur Spine J* 16:2206-2214.
- Kotwal A, Schmidt CE (2001) Electrical stimulation alters protein adsorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials. *Biomaterials* 22:1055-1064.
- Koyano T, Minoura N, Nagura M, Kobayashi K (1998) Attachment and growth of cultured fibroblast cells on PVA/chitosan-blended hydrogels. *J Biomed Mater Res* 39:486-490.
- Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ (1988) Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol* 107:1589-1598.
- Kuijpers AJ, van Wachem PB, van Luyn MJ, Plantinga JA, Engbers GH, Krijgsveld J, Zaat SA, Dankert J, Feijen J (2000) In vivo compatibility and degradation of crosslinked gelatin gels incorporated in knitted Dacron. *J Biomed Mater Res* 51:136-145.
- Labrador RO, Buti M, Navarro X (1995) Peripheral nerve repair: role of agarose matrix density on functional recovery. *Neuroreport* 6:2022-2026.

- Labrador RO, Buti M, Navarro X (1998) Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp Neurol* 149:243-252.
- Lago N, Ceballos D, Rodriguez FJ, Stieglitz T, Navarro X (2005) Long term assessment of axonal regeneration through polyimide regenerative electrodes to interface the peripheral nerve. *Biomaterials* 26:2021-2031.
- Leaver SG, Harvey AR, Plant GW (2006) Adult olfactory ensheathing glia promote the long-distance growth of adult retinal ganglion cell neurites in vitro. *Glia* 53:467-476.
- Lee IH, Bulte JW, Schweinhardt P, Douglas T, Trifunovski A, Hofstetter C, Olson L, Spenger C (2004) In vivo magnetic resonance tracking of olfactory ensheathing glia grafted into the rat spinal cord. *Exp Neurol* 187:509-516.
- Lee J, Kuroda S, Shichinohe H, Ikeda J, Seki T, Hida K, Tada M, Sawada K, Iwasaki Y (2003) Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice. *Neuropathology* 23:169-180.
- Lee YS, Hsiao I, Lin VW (2002) Peripheral nerve grafts and aFGF restore partial hindlimb function in adult paraplegic rats. *J Neurotrauma* 19:1203-1216.
- Lee YS, Lin CY, Robertson RT, Yu J, Deng X, Hsiao I, Lin VW (2006) Re-growth of catecholaminergic fibers and protection of cholinergic spinal cord neurons in spinal repaired rats. *Eur J Neurosci* 23:693-702.
- Lenihan DV, Carter AJ, Gilchrist T, Healy DM, Miller IA, Myles LM, Glasby MA (1998) Biodegradable controlled release glass in the repair of peripheral nerve injuries. *J Hand Surg [Br]* 23:588-593.
- Letourneau PC (1975) Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. *Dev Biol* 44:92-101.
- Li Y, Field PM, Raisman G (1998) Regeneration of adult rat corticospinal axons induced by transplanted olfactory ensheathing cells. *J Neurosci* 18:10514-10524.
- Lieberman AR (1971) The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int Rev Neurobiol* 14:49-124.
- Lietz M, Ullrich A, Schulte-Eversum C, Oberhoffner S, Fricke C, Muller HW, Schlosshauer B (2006) Physical and biological performance of a novel block copolymer nerve guide. *Biotechnol Bioeng* 93:99-109.
- Liu X, Lim JY, Donahue HJ, Dhurjati R, Mastro AM, Vogler EA (2007) Influence of substratum surface chemistry/energy and topography on the human fetal osteoblastic cell line hFOB 1.19: Phenotypic and genotypic responses observed in vitro. *Biomaterials* 28:4535-4550.
- Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, Dong HX, Wu YJ, Fan GS, Jacquin MF, Hsu CY, Choi DW (1997) Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 17:5395-5406.
- Ljungberg C, Johansson-Ruden G, Bostrom KJ, Novikov L, Wiberg M (1999) Neuronal survival using a resorbable synthetic conduit as an alternative to primary nerve repair. *Microsurgery* 19:259-264.

- Lopez-Vales R, Fores J, Navarro X, Verdu E (2007) Chronic transplantation of olfactory ensheathing cells promotes partial recovery after complete spinal cord transection in the rat. *Glia* 55:303-311.
- Lopez-Vales R, Fores J, Verdu E, Navarro X (2006) Acute and delayed transplantation of olfactory ensheathing cells promote partial recovery after complete transection of the spinal cord. *Neurobiol Dis* 21:57-68.
- Lore AB, Hubbell JA, Bobb DS, Jr., Ballinger ML, Loftin KL, Smith JW, Smyers ME, Garcia HD, Bittner GD (1999) Rapid induction of functional and morphological continuity between severed ends of mammalian or earthworm myelinated axons. *J Neurosci* 19:2442-2454.
- Lu J, Feron F, kay-Sim A, Waite PM (2002) Olfactory ensheathing cells promote locomotor recovery after delayed transplantation into transected spinal cord. *Brain* 125:14-21.
- Lu MC, Hsiang SW, Lai TY, Yao CH, Lin LY, Chen YS (2007) Influence of cross-linking degree of a biodegradable genipin-cross-linked gelatin guide on peripheral nerve regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed* 18:843-863.
- Luo K, Yin J, Khutoryanskaya OV, Khutoryanskiy VV (2008) Mucoadhesive and elastic films based on blends of chitosan and hydroxyethylcellulose. *Macromol Biosci* 8:184-192.
- Madhally SV, Matthew HW (1999) Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 20:1133-1142.
- Madison R, da Silva CF, Dikkes P, Chiu TH, Sidman RL (1985) Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin-containing gel. *Exp Neurol* 88:767-772.
- Madison RD, da SC, Dikkes P, Sidman RL, Chiu TH (1987) Peripheral nerve regeneration with entubulation repair: comparison of biodegradable nerve guides versus polyethylene tubes and the effects of a laminin-containing gel. *Exp Neurol* 95:378-390.
- Mandys V, van der NR, Bar PR, Gispén WH (1991) Cultivation of rat fetal spinal cord slices in a semi-solid medium: a new approach to studying axonal outgrowth and regeneration. *J Neurosci Methods* 38:63-69.
- Mannard A, Stein RB, Charles D (1974) Regeneration electrode units: implants for recording from single peripheral nerve fibers in freely moving animals. *Science* 183:547-549.
- Manthorpe M, Engvall E, Ruoslahti E, Longo FM, Davis GE, Varon S (1983) Laminin promotes neuritic regeneration from cultured peripheral and central neurons. *J Cell Biol* 97:1882-1890.
- Mao J, Zhao L, De YK, Shang Q, Yang G, Cao Y (2003) Study of novel chitosan-gelatin artificial skin in vitro. *J Biomed Mater Res A* 64:301-308.
- Mao JS, Cui YL, Wang XH, Sun Y, Yin YJ, Zhao HM, De YK (2004) A preliminary study on chitosan and gelatin polyelectrolyte complex cytocompatibility by cell cycle and apoptosis analysis. *Biomaterials* 25:3973-3981.
- Marbot R (1997) Selection of pyrolysis temperatures for the analysis of humic substances and related materials 1. Cellulose and chitin. *J Anal Appl Pyrol* 39:97-104.
- Margel S, Vogler EA, Firment L, Watt T, Haynie S, Sogah DY (1993) Peptide, protein, and cellular interactions with self-assembled monolayer model surfaces. *J Biomed Mater Res* 27:1463-1476.

- Marinesco (1910) Nouvelles contributions à l'étude de la régénérescence des fibres du syst. nerv.central. *Jour für Psychol V Neurol* XVII.
- Martinez-Serrano A, Rubio FJ, Navarro B, Bueno C, Villa A (2001) Human neural stem and progenitor cells: in vitro and in vivo properties, and potential for gene therapy and cell replacement in the CNS. *Curr Gene Ther* 1:279-299.
- Mason MR, Lieberman AR, Anderson PN (2003) Corticospinal neurons up-regulate a range of growth-associated genes following intracortical, but not spinal, axotomy. *Eur J Neurosci* 18:789-802.
- Matsuda A, Kobayashi H, Itoh S, Kataoka K, Tanaka J (2005) Immobilization of laminin peptide in molecularly aligned chitosan by covalent bonding. *Biomaterials* 26:2273-2279.
- Matthiessen HP, Schmalenbach C, Muller HW (1989) Astroglia-released neurite growth-inducing activity for embryonic hippocampal neurons is associated with laminin bound in a sulfated complex and free fibronectin. *Glia* 2:177-188.
- McCarthy KD, de VJ (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85:890-902.
- McDonald JW, Althomsons SP, Hyrc KL, Choi DW, Goldberg MP (1998) Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat Med* 4:291-297.
- McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW (1999) Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 5:1410-1412.
- McTigue DM, Wei P, Stokes BT (2001) Proliferation of NG2-positive cells and altered oligodendrocyte numbers in the contused rat spinal cord. *J Neurosci* 21:3392-3400.
- Melville S, Sherburn TE, Coggeshall RE (1989) Preservation of sensory cells by placing stumps of transected nerve in an impermeable tube. *Exp Neurol* 105:311-315.
- Merle M, Dellon AL, Campbell JN, Chang PS (1989) Complications from silicon-polymer intubulation of nerves. *Microsurgery* 10:130-133.
- Merrifield JD, Davids WG, MacRae JD, Amirbahman A (2004) Uptake of mercury by thiol-grafted chitosan gel beads. *Water Res* 38:3132-3138.
- Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B (2003) Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1364-1369.
- Mi FL, Shyu SS, Wu YB, Lee ST, Shyong JY, Huang RN (2001) Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials* 22:165-173.
- Middelkoop E, de Vries HJ, Ruuls L, Everts V, Wildevuur CH, Westerhof W (1995) Adherence, proliferation and collagen turnover by human fibroblasts seeded into different types of collagen sponges. *Cell Tissue Res* 280:447-453.
- Mihai G, Nout YS, Tovar CA, Miller BA, Schmalbrock P, Bresnahan JC, Beattie MS (2008) Longitudinal comparison of two severities of unilateral cervical spinal cord injury using magnetic resonance imaging in rats. *J Neurotrauma* 25:1-18.

- Ming G, Henley J, Tessier-Lavigne M, Song H, Poo M (2001) Electrical activity modulates growth cone guidance by diffusible factors. *Neuron* 29:441-452.
- Mingyu C, Kai G, Jiamou L, Yandao G, Nanming Z, Xiufang Z (2004) Surface modification and characterization of chitosan film blended with poly-L-lysine. *J Biomater Appl* 19:59-75.
- Mohammad J, Shenaq J, Rabinovsky E, Shenaq S (2000) Modulation of peripheral nerve regeneration: a tissue-engineering approach. The role of amnion tube nerve conduit across a 1-centimeter nerve gap. *Plast Reconstr Surg* 105:660-666.
- Mohanna PN, Young RC, Wiberg M, Terenghi G (2003) A composite poly-hydroxybutyrate-glia growth factor conduit for long nerve gap repairs. *J Anat* 203:553-565.
- Monteiro OA, Jr., Airolidi C (1999) Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *Int J Biol Macromol* 26:119-128.
- Mosesson MW, Kaminski M (1990) The acceleratory effect of thrombin on fibrin clot assembly. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1:475-478.
- Murakami T, Fujimoto Y, Yasunaga Y, Ishida O, Tanaka N, Ikuta Y, Ochi M (2003) Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. *Brain Res* 974:17-24.
- Muzzarelli R, Tarsi R, Filippini O, Giovanetti E, Biagini G, Varaldo PE (1990) Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrob Agents Chemother* 34:2019-2023.
- Mykатыn TM, Mackinnon SE, McDonald JW (2004) Stem cell transplantation and other novel techniques for promoting recovery from spinal cord injury. *Transpl Immunol* 12:343-358.
- Navarro X, Valero A, Gudino G, Fores J, Rodriguez FJ, Verdu E, Pascual R, Cuadras J, Nieto-Sampedro M (1999) Ensheathing glia transplants promote dorsal root regeneration and spinal reflex restitution after multiple lumbar rhizotomy. *Ann Neurol* 45:207-215.
- Neafsey EJ, Bold EL, Haas G, Hurley-Gius KM, Quirk G, Sievert CF, Terreberry RR (1986) The organization of the rat motor cortex: a microstimulation mapping study. *Brain Res* 396:77-96.
- Nehls V, Herrmann R (1996) The configuration of fibrin clots determines capillary morphogenesis and endothelial cell migration. *Microvasc Res* 51:347-364.
- Nicoli AN, Fini M, Rocca M, Giavaresi G, Giardino R (2000) Guided regeneration with resorbable conduits in experimental peripheral nerve injuries. *Int Orthop* 24:121-125.
- Nieto-Sampedro M (1999) Neurite outgrowth inhibitors in gliotic tissue. *Adv Exp Med Biol* 468:207-224.
- Nieto-Sampedro M (2003) Central nervous system lesions that can and those that cannot be repaired with the help of olfactory bulb ensheathing cell transplants. *Neurochem Res* 28:1659-1676.
- Nieto-Sampedro M, Collazos-Castro JE, Taylor JS, Gudino-Cabrera G, Verdu-Navarro E, Pascual-Piedrola JI, Insausti-Serrano R (2002) [Traumatic injuries to the central nervous system and their repair]. *Rev Neurol* 35:534-552.
- Nieto-Sampedro M, Lewis ER, Cotman CW, Manthorpe M, Skaper SD, Barbin G, Longo FM, Varon S (1982) Brain injury causes a time-dependent increase in neuronotrophic activity at the lesion site. *Science* 217:860-861.

- Nieto-Sampedro M, Manthrope M, Barbin G, Varon S, Cotman CW (1983) Injury-induced neuronotrophic activity in adult rat brain: correlation with survival of delayed implants in the wound cavity. *J Neurosci* 3:2219-2229.
- Nieto-Sampedro M, Whittemore SR, Needels DL, Larson J, Cotman CW (1984) The survival of brain transplants is enhanced by extracts from injured brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:6250-6254.
- Nix WA, Hopf HC (1983) Electrical stimulation of regenerating nerve and its effect on motor recovery. *Brain Res* 272:21-25.
- Novikov LN, Novikova LN, Mosahebi A, Wiberg M, Terenghi G, Kellerth JO (2002) A novel biodegradable implant for neuronal rescue and regeneration after spinal cord injury. *Biomaterials* 23:3369-3376.
- Novikova LN, Pettersson J, Brohlin M, Wiberg M, Novikov LN (2008) Biodegradable poly-beta-hydroxybutyrate scaffold seeded with Schwann cells to promote spinal cord repair. *Biomaterials* 29:1198-1206.
- O'Connor SM, Stenger DA, Shaffer KM, Ma W (2001) Survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in three-dimensional agarose and collagen gel matrices. *Neurosci Lett* 304:189-193.
- O'Connor SM, Stenger DA, Shaffer KM, Maric D, Barker JL, Ma W (2000) Primary neural precursor cell expansion, differentiation and cytosolic Ca(2+) response in three-dimensional collagen gel. *J Neurosci Methods* 102:187-195.
- Olayo R, Rios C, Salgado-Ceballos H, Cruz GJ, Morales J, Olayo MG, Caraz-Zubeldia M, Alvarez AL, Mondragon R, Morales A, Az-Ruiz A (2008) Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma. *J Mater Sci Mater Med* 19:817-826.
- Onishi H, Machida Y (1999) Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials* 20:175-182.
- Oudega M, Xu XM (2006) Schwann cell transplantation for repair of the adult spinal cord. *J Neurotrauma* 23:453-467.
- Owens NF, Gingell D, Trommler A (1988) Cell adhesion to hydroxyl groups of a monolayer film. *J Cell Sci* 91 (Pt 2):269-279.
- Pan HC, Cheng FC, Lai SZ, Yang DY, Wang YC, Lee MS (2008) Enhanced regeneration in spinal cord injury by concomitant treatment with granulocyte colony-stimulating factor and neuronal stem cells. *J Clin Neurosci* 15:656-664.
- Pascual JI, Gudino-Cabrera G, Insausti R, Nieto-Sampedro M (2002) Spinal implants of olfactory ensheathing cells promote axon regeneration and bladder activity after bilateral lumbosacral dorsal rhizotomy in the adult rat. *J Urol* 167:1522-1526.
- Passaniti A, Taylor RM, Pili R, Guo Y, Long PV, Haney JA, Pauly RR, Grant DS, Martin GR (1992) A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest* 67:519-528.

- Patel S, Kurpinski K, Quigley R, Gao H, Hsiao BS, Poo MM, Li S (2007) Bioactive nanofibers: synergistic effects of nanotopography and chemical signaling on cell guidance. *Nano Lett* 7:2122-2128.
- Patist CM, Mulder MB, Gautier SE, Maquet V, Jerome R, Oudega M (2004) Freeze-dried poly(D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds impregnated with brain-derived neurotrophic factor in the transected adult rat thoracic spinal cord. *Biomaterials* 25:1569-1582.
- Pelham RJ, Jr., Wang Y (1997) Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13661-13665.
- Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, Magistretti PJ (2007) Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55:1251-1262.
- Perkins L, Babbini A, Freeman LW (1964) Distal-proximal nerve implants in spinal cord transection. *Neurology* 14:949-954.
- Pfister LA, Papaloizos M, Merkle HP, Gander B (2007) Hydrogel nerve conduits produced from alginate/chitosan complexes. *J Biomed Mater Res A* 80:932-937.
- Piotrowicz A, Shoichet MS (2006) Nerve guidance channels as drug delivery vehicles. *Biomaterials* 27:2018-2027.
- Pittier R, Sauthier F, Hubbell JA, Hall H (2005) Neurite extension and in vitro myelination within three-dimensional modified fibrin matrices. *J Neurobiol* 63:1-14.
- Pixley SK, de VJ (1984) Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res* 317:201-209.
- Plant GW, Chirila TV, Harvey AR (1998) Implantation of collagen IV/poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels containing Schwann cells into the lesioned rat optic tract. *Cell Transplant* 7:381-391.
- Polentes J, Stamegna JC, Nieto-Sampedro M, Gauthier P (2004) Phrenic rehabilitation and diaphragm recovery after cervical injury and transplantation of olfactory ensheathing cells. *Neurobiol Dis* 16:638-653.
- Prang P, Muller R, Eljaouhari A, Heckmann K, Kunz W, Weber T, Faber C, Vroemen M, Bogdahn U, Weidner N (2006) The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels. *Biomaterials* 27:3560-3569.
- Prashanth KVH, Kittur FS, Tharanathan RN (2002) Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions. *Carbohydr Polym* 50:27-33.
- Priestley JV, Ramer MS, King VR, McMahon SB, Brown RA (2002) Stimulating regeneration in the damaged spinal cord. *J Physiol Paris* 96:123-133.
- Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petratos S (2004) Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 15:415-436.
- Raimondo S, Nicolino S, Tos P, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG, Perroteau I, Geuna S (2005) Schwann cell behavior after nerve repair by means of tissue-engineered muscle-vein combined guides. *J Comp Neurol* 489:249-259.

- Ramón y Cajal S. (1905) Textura del sistema nervioso del hombre y los vertebrados. Imprenta y librería de Nicolás Moya Madrid.
- Ramón y Cajal S. (1914) Estudios sobre degeneración y regeneración del sistema nervioso. Imprenta hijos de Nicolás Moya Madrid.
- Ramón y Cajal S (1905) Notas preventivas sobre la degeneración y regeneración de las vías nerviosas centrales. *Trab Lab Invest Biol* IV.
- Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J (2000) Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* 25:425-435.
- Ramon-Cueto A, Nieto-Sampedro M (1992) Glial cells from adult rat olfactory bulb: immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells. *Neuroscience* 47:213-220.
- Ramon-Cueto A, Nieto-Sampedro M (1994) Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants. *Exp Neurol* 127:232-244.
- Ramon-Cueto A, Plant GW, Avila J, Bunge MB (1998) Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci* 18:3803-3815.
- Rangappa N, Romero A, Nelson KD, Eberhart RC, Smith GM (2000) Laminin-coated poly(L-lactide) filaments induce robust neurite growth while providing directional orientation. *J Biomed Mater Res* 51:625-634.
- Rege PR, Garmise RJ, Block LH (2003) Spray-dried chitinosans. Part I: preparation and characterization. *Int J Pharm* 252:41-51.
- Rich KM, Disch SP, Eichler ME (1989) The influence of regeneration and nerve growth factor on the neuronal cell body reaction to injury. *J Neurocytol* 18:569-576.
- Richards M, Dahiyat BI, Arm DM, Brown PR, Leong KW (1991) Evaluation of polyphosphates and polyphosphonates as degradable biomaterials. *J Biomed Mater Res* 25:1151-1167.
- Risbud M, Hardikar A, Bhonde R (2000) Chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as candidate for islet immunoisolation: in vitro biocompatibility evaluation. *Cell Transplant* 9:25-31.
- Risbud MV, Bhonde MR, Bhonde RR (2001) Effect of chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogel on proliferation and cytokine expression of endothelial cells: implications in islet immunoisolation. *J Biomed Mater Res* 57:300-305.
- Robinson GA, Madison RD (2000) Survival of adult rat retinal ganglion cells with regrown axons in peripheral nerve grafts: a comparison of graft attachment with suture of fibrin glue. *J Neurosurg* 93:275-278.
- Ronn LC, Ralets I, Hartz BP, Bech M, Berezin A, Berezin V, Moller A, Bock E (2000) A simple procedure for quantification of neurite outgrowth based on stereological principles. *J Neurosci Methods* 100:25-32.
- Rosales-Cortes M, Peregrina-Sandoval J, Banuelos-Pineda J, Sarabia-Estrada R, Gomez-Rodiles CC, barran-Rodriguez E, Zaitseva GP, Pita-Lopez ML (2003) Immunological study of a chitosan prosthesis in the sciatic nerve regeneration of the axotomized dog. *J Biomater Appl* 18:15-23.

- Rudkin BB, Lazarovici P, Levi BZ, Abe Y, Fujita K, Guroff G (1989) Cell cycle-specific action of nerve growth factor in PC12 cells: differentiation without proliferation. *EMBO J* 8:3319-3325.
- Ruitenbergh MJ, Plant GW, Christensen CL, Blits B, Niclou SP, Harvey AR, Boer GJ, Verhaagen J (2002) Viral vector-mediated gene expression in olfactory ensheathing glia implants in the lesioned rat spinal cord. *Gene Ther* 9:135-146.
- Sakiyama SE, Schense JC, Hubbell JA (1999) Incorporation of heparin-binding peptides into fibrin gels enhances neurite extension: an example of designer matrices in tissue engineering. *FASEB J* 13:2214-2224.
- Salgado-Ceballos H, Guizar-Sahagun G, Feria-Velasco A, Grijalva I, Espitia L, Ibarra A, Madrazo I (1998) Spontaneous long-term remyelination after traumatic spinal cord injury in rats. *Brain Res* 782:126-135.
- Santos PM, Winterowd JG, Allen GG, Bothwell MA, Rubel EW (1991) Nerve growth factor: increased angiogenesis without improved nerve regeneration. *Otolaryngol Head Neck Surg* 105:12-25.
- Schense JC, Hubbell JA (2000) Three-dimensional migration of neurites is mediated by adhesion site density and affinity. *J Biol Chem* 275:6813-6818.
- Schmidt CE, Leach JB (2003) Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annu Rev Biomed Eng* 5:293-347.
- Schmidt CE, Shastri VR, Vacanti JP, Langer R (1997) Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8948-8953.
- Schonauer C, Tessitore E, Barbagallo G, Albanese V, Moraci A (2004) The use of local agents: bone wax, gelatin, collagen, oxidized cellulose. *Eur Spine J* 13 Suppl 1:S89-S96.
- Schwab ME, Bartholdi D (1996) Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 76:319-370.
- Schwartz M, Lazarov-Spiegler O, Rapalino O, Agranov I, Velan G, Hadani M (1999) Potential repair of rat spinal cord injuries using stimulated homologous macrophages. *Neurosurgery* 44:1041-1045.
- Seckel BR, Jones D, Hekimian KJ, Wang KK, Chakalis DP, Costas PD (1995) Hyaluronic acid through a new injectable nerve guide delivery system enhances peripheral nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Res* 40:318-324.
- Selmaj K, Shafit-Zagardo B, Aquino DA, Farooq M, Raine CS, Norton WT, Brosnan CF (1991) Tumor necrosis factor-induced proliferation of astrocytes from mature brain is associated with down-regulation of glial fibrillary acidic protein mRNA. *J Neurochem* 57:823-830.
- Sennerby L, Rostlund T, Albrektsson B, Albrektsson T (1987) Acute tissue reactions to potassium alginate with and without colour/flavour additives. *Biomaterials* 8:49-52.
- Shapiro L, Cohen S (1997) Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomaterials* 18:583-590.
- Sheppard AM, Hamilton SK, Pearlman AL (1991) Changes in the distribution of extracellular matrix components accompany early morphogenetic events of mammalian cortical development. *J Neurosci* 11:3928-3942.

- Shi C, Zhu Y, Ran X, Wang M, Su Y, Cheng T (2006) Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *J Surg Res* 133:185-192.
- Siegel SM, Daly O (1966) Regulation of Betacyanin Efflux from Beet Root by Poly-L-Lysine, Ca-Ion and Other Substances. *Plant Physiol* 41:1429-1434.
- Sierra DH (1993) Fibrin sealant adhesive systems: a review of their chemistry, material properties and clinical applications. *J Biomater Appl* 7:309-352.
- Silver J, Lorenz SE, Wahlsten D, Coughlin J (1982) Axonal guidance during development of the great cerebral commissures: descriptive and experimental studies, in vivo, on the role of preformed glial pathways. *J Comp Neurol* 210:10-29.
- Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5:146-156.
- Snider WD, Thanedar S (1989) Target dependence of hypoglossal motor neurons during development in maturity. *J Comp Neurol* 279:489-498.
- Soldani G, Varelli G, Minnocci A, Dario P (1998) Manufacturing and microscopical characterisation of polyurethane nerve guidance channel featuring a highly smooth internal surface. *Biomaterials* 19:1919-1924.
- Sonigra RJ, Brighton PC, Jacoby J, Hall S, Wigley CB (1999) Adult rat olfactory nerve ensheathing cells are effective promoters of adult central nervous system neurite outgrowth in coculture. *Glia* 25:256-269.
- Soria JM, Martinez RC, Bahamonde O, Garcia Cruz DM, Salmeron SM, Garcia Esparza MA, Casas C, Guzman M, Navarro X, Gomez Ribelles JL, Garcia Verdugo JM, Monleon PM, Barcia JA (2007) Influence of the substrate's hydrophilicity on the in vitro Schwann cells viability. *J Biomed Mater Res A* 83:463-470.
- Sterne GD, Brown RA, Green CJ, Terenghi G (1997) Neurotrophin-3 delivered locally via fibronectin mats enhances peripheral nerve regeneration. *Eur J Neurosci* 9:1388-1396.
- Stokols S, Tuszynski MH (2004) The fabrication and characterization of linearly oriented nerve guidance scaffolds for spinal cord injury. *Biomaterials* 25:5839-5846.
- Stokols S, Tuszynski MH (2006) Freeze-dried agarose scaffolds with uniaxial channels stimulate and guide linear axonal growth following spinal cord injury. *Biomaterials* 27:443-451.
- Stone AL, Epstein P (1977) The aggregation of basic polypeptide residues bound to heparin. *Biochim Biophys Acta* 497:298-306.
- Stroebe H (1894) Experimentelle Untersuchungen über die degenerativen und reparationsartigen Vorgänge bei der Heilung von Verletzungen des Rückenmarks, usw. *Beitr Pathol Anat Allgem Pathol* 15:383-490.
- Subramanian A, Vu D, Larsen GF, Lin HY (2005) Preparation and evaluation of the electrospun chitosan/PEO fibers for potential applications in cartilage tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* 16:861-873.
- Sufan W, Suzuki Y, Tanihara M, Ohnishi K, Suzuki K, Endo K, Nishimura Y (2001) Sciatic nerve regeneration through alginate with tubulation or nontubulation repair in cat. *J Neurotrauma* 18:329-338.
- Sugar O, Gerard RW (1940) Spinal cord regeneration in the rat. *J Neurophysiol* 3:1-19.

- Suh JK, Matthew HW (2000) Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 21:2589-2598.
- Sundaram J, Durance TD, Wang R (2008) Porous scaffold of gelatin-starch with nanohydroxyapatite composite processed via novel microwave vacuum drying. *Acta Biomater* 4:932-942.
- Suzuki K, Suzuki Y, Ohnishi K, Endo K, Tanihara M, Nishimura Y (1999a) Regeneration of transected spinal cord in young adult rats using freeze-dried alginate gel. *Neuroreport* 10:2891-2894.
- Suzuki M, Itoh S, Yamaguchi I, Takakuda K, Kobayashi H, Shinomiya K, Tanaka J (2003) Tendon chitosan tubes covalently coupled with synthesized laminin peptides facilitate nerve regeneration in vivo. *J Neurosci Res* 72:646-659.
- Suzuki Y, Kitaura M, Wu S, Kataoka K, Suzuki K, Endo K, Nishimura Y, Ide C (2002) Electrophysiological and horseradish peroxidase-tracing studies of nerve regeneration through alginate-filled gap in adult rat spinal cord. *Neurosci Lett* 318:121-124.
- Suzuki Y, Tanihara M, Ohnishi K, Suzuki K, Endo K, Nishimura Y (1999b) Cat peripheral nerve regeneration across 50 mm gap repaired with a novel nerve guide composed of freeze-dried alginate gel. *Neurosci Lett* 259:75-78.
- Takami T, Oudega M, Bates ML, Wood PM, Kleitman N, Bunge MB (2002) Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. *J Neurosci* 22:6670-6681.
- Taniuchi M, Clark HB, Johnson EM, Jr. (1986) Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4094-4098.
- Taravel MN, Domard A (1993) Relation between the physicochemical characteristics of collagen and its interactions with chitosan: I. *Biomaterials* 14:930-938.
- Tate MC, Shear DA, Hoffman SW, Stein DG, Laplaca MC (2001) Biocompatibility of methylcellulose-based constructs designed for intracerebral gelation following experimental traumatic brain injury. *Biomaterials* 22:1113-1123.
- Tator CH (1995) Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol* 5:407-413.
- Taylor JS, Muneton-Gomez VC, Eguia-Recuero R, Nieto-Sampedro M (2001) Transplants of olfactory bulb ensheathing cells promote functional repair of multiple dorsal rhizotomy. *Prog Brain Res* 132:641-654.
- Taylor SJ, McDonald JW, III, Sakiyama-Elbert SE (2004) Controlled release of neurotrophin-3 from fibrin gels for spinal cord injury. *J Control Release* 98:281-294.
- Taylor SJ, Rosenzweig ES, McDonald JW, III, Sakiyama-Elbert SE (2006) Delivery of neurotrophin-3 from fibrin enhances neuronal fiber sprouting after spinal cord injury. *J Control Release* 113:226-235.
- Taylor SJ, Sakiyama-Elbert SE (2006) Effect of controlled delivery of neurotrophin-3 from fibrin on spinal cord injury in a long term model. *J Control Release* 116:204-210.
- Tello JF (1911) La influencia del neurotropismo en la regeneración de los centros nerviosos. *Trab Lab Invest Biol* 9:123-159.

- Thangnipon W, Kingsbury A, Webb M, Balazs R (1983) Observations on rat cerebellar cells in vitro: influence of substratum, potassium concentration and relationship between neurones and astrocytes. *Brain Res* 313:177-189.
- Tian WM, Hou SP, Ma J, Zhang CL, Xu QY, Lee IS, Li HD, Spector M, Cui FZ (2005a) Hyaluronic acid-poly-D-lysine-based three-dimensional hydrogel for traumatic brain injury. *Tissue Eng* 11:513-525.
- Tian WM, Zhang CL, Hou SP, Yu X, Cui FZ, Xu QY, Sheng SL, Cui H, Li HD (2005b) Hyaluronic acid hydrogel as Nogo-66 receptor antibody delivery system for the repairing of injured rat brain: in vitro. *J Control Release* 102:13-22.
- Tillman J, Ullm A, Madihally SV (2006) Three-dimensional cell colonization in a sulfate rich environment. *Biomaterials* 27:5618-5626.
- Tisay KT, Key B (1999) The extracellular matrix modulates olfactory neurite outgrowth on ensheathing cells. *J Neurosci* 19:9890-9899.
- Tobias CA, Dhoot NO, Wheatley MA, Tessler A, Murray M, Fischer I (2001) Grafting of encapsulated BDNF-producing fibroblasts into the injured spinal cord without immune suppression in adult rats. *J Neurotrauma* 18:287-301.
- Tobias CA, Han SS, Shumsky JS, Kim D, Tumolo M, Dhoot NO, Wheatley MA, Fischer I, Tessler A, Murray M (2005) Alginate encapsulated BDNF-producing fibroblast grafts permit recovery of function after spinal cord injury in the absence of immune suppression. *J Neurotrauma* 22:138-156.
- Tomihata K, Ikada Y (1997) In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials* 18:567-575.
- Tong XJ, Hirai K, Shimada H, Mizutani Y, Izumi T, Toda N, Yu P (1994) Sciatic nerve regeneration navigated by laminin-fibronectin double coated biodegradable collagen grafts in rats. *Brain Res* 663:155-162.
- Tonge DA, Golding JP, Edbladh M, Kroon M, Ekstrom PE, Edstrom A (1997) Effects of extracellular matrix components on axonal outgrowth from peripheral nerves of adult animals in vitro. *Exp Neurol* 146:81-90.
- Traub RJ, Solodkin A, Ruda MA (1989) Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the cat lumbosacral spinal cord and the effects of multiple dorsal rhizotomies. *J Comp Neurol* 287:225-237.
- Tsai EC, Dalton PD, Shoichet MS, Tator CH (2004) Synthetic hydrogel guidance channels facilitate regeneration of adult rat brainstem motor axons after complete spinal cord transection. *J Neurotrauma* 21:789-804.
- Tsai EC, Dalton PD, Shoichet MS, Tator CH (2006) Matrix inclusion within synthetic hydrogel guidance channels improves specific supraspinal and local axonal regeneration after complete spinal cord transection. *Biomaterials* 27:519-533.
- Ueno H, Mori T, Fujinaga T (2001) Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev* 52:105-115.

- Vaccarino FM, Fagel DM, Ganat Y, Maragnoli ME, Ment LR, Ohkubo Y, Schwartz ML, Silbereis J, Smith KM (2007) Astroglial cells in development, regeneration, and repair. *Neuroscientist* 13:173-185.
- Valentin R, Molvinger K, Viton C, Domard A, Quignard F (2005) From hydrocolloids to high specific surface area porous supports for catalysis. *Biomacromolecules* 6:2785-2792.
- Valentini RF, Aebischer P, Winn SR, Galletti PM (1987) Collagen- and laminin-containing gels impede peripheral nerve regeneration through semipermeable nerve guidance channels. *Exp Neurol* 98:350-356.
- Valentini RF, Vargo TG, Gardella JA, Jr., Aebischer P (1993) Patterned neuronal attachment and outgrowth on surface modified, electrically charged fluoropolymer substrates. *J Biomater Sci Polym Ed* 5:13-36.
- Valero-Cabre A, Tsironis K, Skouras E, Perego G, Navarro X, Neiss WF (2001) Superior muscle reinnervation after autologous nerve graft or poly-L-lactide-epsilon-caprolactone (PLC) tube implantation in comparison to silicone tube repair. *J Neurosci Res* 63:214-223.
- Valverde F, Lopez-Mascaraque L (1991) Neuroglial arrangements in the olfactory glomeruli of the hedgehog. *J Comp Neurol* 307:658-674.
- Van de Velde K, Kiekens P (2004) Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state ¹³C NMR. *Carbohydr Polym* 58:409-416.
- van Kooten TG, Schakenraad JM, van der Mei HC, Busscher HJ (1992) Influence of substratum wettability on the strength of adhesion of human fibroblasts. *Biomaterials* 13:897-904.
- van Wachem PB, Beugeling T, Feijen J, Bantjes A, Detmers JP, van Aken WG (1985) Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities. *Biomaterials* 6:403-408.
- Vanden NS, Wallace N, Muccio D, Turtz A, Pinter MJ (1993) Adult spinal motoneurons remain viable despite prolonged absence of functional synaptic contact with muscle. *Exp Neurol* 123:147-156.
- Vargas ME, Barres BA (2007) Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu Rev Neurosci* 30:153-179.
- Ventimiglia R, Jones BE, Moller A (1995) A quantitative method for morphometric analysis in neuronal cell culture: unbiased estimation of neuron area and number of branch points. *J Neurosci Methods* 57:63-66.
- Verdu E, Garcia-Alias G, Fores J, Gudino-Cabrera G, Muneton VC, Nieto-Sampedro M, Navarro X (2001) Effects of ensheathing cells transplanted into photochemically damaged spinal cord. *Neuroreport* 12:2303-2309.
- Verdu E, Garcia-Alias G, Fores J, Lopez-Vales R, Navarro X (2003) Olfactory ensheathing cells transplanted in lesioned spinal cord prevent loss of spinal cord parenchyma and promote functional recovery. *Glia* 42:275-286.
- Verdu E, Navarro X, Gudino-Cabrera G, Rodriguez FJ, Ceballos D, Valero A, Nieto-Sampedro M (1999) Olfactory bulb ensheathing cells enhance peripheral nerve regeneration. *Neuroreport* 10:1097-1101.

- Verma V, Verma P, Kar S, Ray P, Ray AR (2007) Fabrication of agar-gelatin hybrid scaffolds using a novel entrapment method for in vitro tissue engineering applications. *Biotechnol Bioeng* 96:392-400.
- Vogler EA (1988) Thermodynamics of short-term cell adhesion in vitro. *Biophys J* 53:759-769.
- Vogler EA (1999) Water and the acute biological response to surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed* 10:1015-1045.
- von MJ, Brosamle C, Metz GA, Schwab ME (1998) Regeneration and sprouting of chronically injured corticospinal tract fibers in adult rats promoted by NT-3 and the mAb IN-1, which neutralizes myelin-associated neurite growth inhibitors. *Exp Neurol* 154:583-594.
- Wang A, Ao Q, Wei Y, Gong K, Liu X, Zhao N, Gong Y, Zhang X (2007) Physical properties and biocompatibility of a porous chitosan-based fiber-reinforced conduit for nerve regeneration. *Biotechnol Lett* 29:1697-1702.
- Wang GY, Hirai K, Shimada H (1992) The role of laminin, a component of Schwann cell basal lamina, in rat sciatic nerve regeneration within antiserum-treated nerve grafts. *Brain Res* 570:116-125.
- Wang J, van Apeldoorn A, de Groot K (2006) Electrolytic deposition of calcium phosphate/chitosan coating on titanium alloy: growth kinetics and influence of current density, acetic acid, and chitosan. *J Biomed Mater Res A* 76:503-511.
- Wang KK, Nemeth IR, Seckel BR, Chakalis-Haley DP, Swann DA, Kuo JW, Bryan DJ, Cetrulo CL, Jr. (1998) Hyaluronic acid enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Microsurgery* 18:270-275.
- Wang S, Wan AC, Xu X, Gao S, Mao HQ, Leong KW, Yu H (2001) A new nerve guide conduit material composed of a biodegradable poly(phosphoester). *Biomaterials* 22:1157-1169.
- Wang X, Hu W, Cao Y, Yao J, Wu J, Gu X (2005) Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft. *Brain* 128:1897-1910.
- Wells MR, Kraus K, Batter DK, Blunt DG, Weremowitz J, Lynch SE, Antoniadis HN, Hansson HA (1997) Gel matrix vehicles for growth factor application in nerve gap injuries repaired with tubes: a comparison of biomatrix, collagen, and methylcellulose. *Exp Neurol* 146:395-402.
- Whitworth IH, Brown RA, Dore C, Green CJ, Terenghi G (1995) Orientated mats of fibronectin as a conduit material for use in peripheral nerve repair. *J Hand Surg [Br]* 20:429-436.
- Whitworth IH, Brown RA, Dore CJ, Anand P, Green CJ, Terenghi G (1996) Nerve growth factor enhances nerve regeneration through fibronectin grafts. *J Hand Surg [Br]* 21:514-522.
- William GM, Herbert JQ (1985) Method of achieving hemostasis inhibiting fibroplasia, and promoting tissue regeneration in a tissue wound. United States.
- Woerly S, Marchand R, Lavalley C (1990) Intracerebral implantation of synthetic polymer/biopolymer matrix: a new perspective for brain repair. *Biomaterials* 11:97-107.
- Woerly S, Marchand R, Lavalley C (1991) Interactions of copolymeric poly(glyceryl methacrylate)-collagen hydrogels with neural tissue: effects of structure and polar groups. *Biomaterials* 12:197-203.

- Woerly S, Petrov P, Sykova E, Roitbak T, Simonova Z, Harvey AR (1999) Neural tissue formation within porous hydrogels implanted in brain and spinal cord lesions: ultrastructural, immunohistochemical, and diffusion studies. *Tissue Eng* 5:467-488.
- Woerly S, Pinet E, de RL, Van DD, Bousmina M (2001) Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides (NeuroGel). *Biomaterials* 22:1095-1111.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000) Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61:364-370.
- Wu JC, Huang WC, Tsai YA, Chen YC, Cheng H (2008) Nerve repair using acidic fibroblast growth factor in human cervical spinal cord injury: a preliminary Phase I clinical study. *J Neurosurg Spine* 8:208-214.
- Xia W, Liu W, Cui L, Liu Y, Zhong W, Liu D, Wu J, Chua K, Cao Y (2004) Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan-gelatin complex scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 71:373-380.
- Xiao M, Klueber KM, Lu C, Guo Z, Marshall CT, Wang H, Roisen FJ (2005) Human adult olfactory neural progenitors rescue axotomized rodent rubrospinal neurons and promote functional recovery. *Exp Neurol* 194:12-30.
- Xu QG, Midha R, Martinez JA, Guo GF, Zochodne DW (2008) Facilitated sprouting in a peripheral nerve injury. *Neuroscience* 152:877-887.
- Xu XM, Guenard V, Kleitman N, Bunge MB (1995) Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. *J Comp Neurol* 351:145-160.
- Yabe JT, Wang FS, Chylinski T, Katchmar T, Shea TB (2001) Selective accumulation of the high molecular weight neurofilament subunit within the distal region of growing axonal neurites. *Cell Motil Cytoskeleton* 50:1-12.
- Yavin Z, Yavin E (1980) Survival and maturation of cerebral neurons on poly(L-lysine) surfaces in the absence of serum. *Dev Biol* 75:454-459.
- Yick LW, Cheung PT, So KF, Wu W (2003) Axonal regeneration of Clarke's neurons beyond the spinal cord injury scar after treatment with chondroitinase ABC. *Exp Neurol* 182:160-168.
- Yin YJ, Cheng GX, Ma JB (1999) Properties of polyelectrolyte complex films of chitosan and gelatin. *Polym Int* 48:429-433.
- Yoshida K, Kohsaka S, Nii S, Idei T, Otani M, Toya S, Tsukada Y (1986) Subcultured astrocytes suppress the proliferation of neuroblasts in vitro. *Neurosci Lett* 70:34-39.
- Yoshii S, Oka M (2001) Peripheral nerve regeneration along collagen filaments. *Brain Res* 888:158-162.
- Yoshii S, Oka M, Shima M, Akagi M, Taniguchi A (2003) Bridging a spinal cord defect using collagen filament. *Spine* 28:2346-2351.
- Yoshii S, Oka M, Shima M, Taniguchi A, Akagi M (2002) 30 mm regeneration of rat sciatic nerve along collagen filaments. *Brain Res* 949:202-208.
- Yoshii S, Oka M, Shima M, Taniguchi A, Taki Y, Akagi M (2004) Restoration of function after spinal cord transection using a collagen bridge. *J Biomed Mater Res A* 70:569-575.

- Yoshii S, Yamamuro T, Ito S, Hayashi M (1987) In vivo guidance of regenerating nerve by laminin-coated filaments. *Exp Neurol* 96:469-473.
- Young RC, Wiberg M, Terenghi G (2002) Poly-3-hydroxybutyrate (PHB): a resorbable conduit for long-gap repair in peripheral nerves. *Br J Plast Surg* 55:235-240.
- Yuan Y, Zhang P, Yang Y, Wang X, Gu X (2004) The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. *Biomaterials* 25:4273-4278.
- Zahir T, Nomura H, Guo XD, Kim H, Tator C, Morshead C, Shoichet M (2008) Bioengineering neural stem/progenitor cell-coated tubes for spinal cord injury repair. *Cell Transplant* 17:245-254.
- Zai LJ, Wrathall JR (2005) Cell proliferation and replacement following contusive spinal cord injury. *Glia* 50:247-257.
- Zhang N, Zhang C, Wen X (2005) Fabrication of semipermeable hollow fiber membranes with highly aligned texture for nerve guidance. *J Biomed Mater Res A* 75:941-949.
- Zheng LF, Wang R, Xu YZ, Yi XN, Zhang JW, Zeng ZC (2008) Calcitonin gene-related peptide dynamics in rat dorsal root ganglia and spinal cord following different sciatic nerve injuries. *Brain Res* 1187:20-32.
- Zhong S, Teo WE, Zhu X, Beuerman RW, Ramakrishna S, Yung LY (2006) An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effects on in vitro fibroblast culture. *J Biomed Mater Res A* 79:456-463.
- Zinck ND, Rafuse VF, Downie JW (2007) Sprouting of CGRP primary afferents in lumbosacral spinal cord precedes emergence of bladder activity after spinal injury. *Exp Neurol* 204:777-790.
- Zisch AH, Zeisberger SM, Ehrbar M, Djonov V, Weber CC, Ziemiecki A, Pasquale EB, Hubbell JA (2004) Engineered fibrin matrices for functional display of cell membrane-bound growth factor-like activities: study of angiogenic signaling by ephrin-B2. *Biomaterials* 25:3245-3257.
- Zurita M, Vaquero J (2004) Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation. *Neuroreport* 15:1105-1108.
- Zurita M, Vaquero J (2006) Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: Functional and morphological outcome one year after transplantation. *Neurosci Lett* 402:51-56.

